

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Taner AKALIN

**PRİMER DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMA
OLGULARINDA PD-1/ PD-L1 EKSPRESYONUNUN, TÜMÖR
MİKROÇEVRESİNİN VE PROGNOSTİK ÖZELLİKLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Güldidar BASMACI

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Nazan ÖZSAN

İZMİR

2019

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca insani değerleri ile de örnek edindiğim, patoloji bilimine dair deneyim ve bilgilerini cömertçe paylaşan, öncelikle Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Taner Akalın olmak üzere eğitimime katkıda bulunan tüm hocalarıma ve uzmanlarıma,

Başta insani ve akademik yönden olmak üzere pek çok alanda bana ışık tutan, daima hoşgörülü ve sabırlı, birlikte çalışmaktan onur duyduğum çok değerli hocam tez danışmanım Doç. Dr. Nazan Özsan' a,

Tez hazırlık sürecimde yanımda olan, yardımlarını esirgemeyen çok kıymetli hocam Prof. Dr. Mine Hekimgil ve Uzm. Dr. Derya Demir'e,

İstatistiksel değerlendirmede ve yorumlamada katkıda bulunan Doç. Dr. Timur Köse'ye,

Başta tez vakalarımın laboratuvar hazırlık aşamasında olmak üzere tüm uzmanlık eğitimim süresince yardım ve destek sağlayan arşiv, kesit, döküm, immünohistokimya laboratuvarı ve idari bölüm görevlilerimize,

Tez vakalarımın doku “mikroarray” yöntemi ile bloklarının ve immünohistokimyasal kesitlerin hazırlanmasında yardım ve desteği için laboratuvar görevlimiz Günce Sönmezocak'a,

Ekipçe zevkle çalıştığımız, tanışmaktan ve sıcak dostluklarını paylaşmaktan dolayı kendimi çok şanslı hissettiğim, kardeşlerim başta Simge Erbil, Betül Geroğlu ve Hamed Jafarzadeh Andabil olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma,

Doğduğum günden beri her türlü fedakârlık, sevgi ve ilgi ile yanımda olan, bu günlere gelmemi sağlayan kıymetlilerim, sevgili annem, babam ve canım kardeşime,

Eğitim ve tez hazırlama sürecim boyunca, sabır, hoşgörü ve sonsuz desteğiyle her zaman yanımda olan sevgili eşim İsmail Basmacı'ya ve küçük yaşından daha büyük sabrı için ayrıca oğlum Nurettin Basmacı'ya teşekkür ederim.

Dr. Güldidar Basmacı

İzmir - 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET	VIII
ABSTRACT	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XIV
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVII
RESİMLER DİZİNİ	XVIII
KISALTMALAR LİSTESİ	XIX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma	4
2.2 Epidemiyolojik Veriler	5
2.3 Etiyoloji	5
2.4 Tümörün Lokalizasyonu	6
2.5 Klinik Özellikler	7
2.6 Mikroskopik Özellikler.....	7
2.7 Morfolojik Varyantlar	9
2.7.1 Sık Görülen Morfolojik Varyantlar	9
2.7.2 Santroblastik Varyant	9
2.7.3 İmmunoblastik Varyant	10
2.7.4 Anaplastik Varyant.....	10
2.7.5 Nadir Morfolojik Varyantlar	11
2.8 İmmunhistokimyasal Özellikler.....	11
2.8.1 Hans Algoritması.....	12
2.9 Tümörün Köken Aldığı Hücre Tipi	13
2.9.1 Tümörün Köken Aldığı Hücre Tipine Göre Alt Tipleme.....	14

2.10	Tümörün Genetik Profili.....	15
2.10.1	Antijen Reseptör Genleri.....	15
2.10.2	Mutasyon Yüğü	15
2.10.3	Kromozomal Translokasyonlar	16
2.11	Genetik Yatkınlık.....	17
2.12	Prognostik ve Prediktif Etkenler.....	17
2.12.1	Klinik Özellikler.....	17
2.12.2	Morfolojik Özellikler.....	18
2.12.3	İmmunhistokimyasal Özellikler	19
2.12.4	Proliferasyon İndeksi.....	20
2.12.5	Genetik özellikler	20
2.12.6	Mikroçevre.....	21
2.12.7	MikroRNA.....	21
2.12.8	Konak (Host) Genetiğı	22
2.12.9	Tedavi.....	22
2.13	Tanısal ve Prognostik Öneme Sahip Yardımcı Yöntemler.....	22
2.13.1	İmmunhistokimyasal Yöntemler	22
2.13.2	CD20.....	23
2.13.3	CD19.....	24
2.13.4	CD79.....	24
2.13.5	PAX5	24
2.13.6	CD3.....	25
2.13.7	CD10 (CALLA/common ALL antigen).....	25
2.13.8	BCL6	25
2.13.9	MUM1/ IRF4 (The multiple myeloma oncogene 1/ interferon regulatory factor)	

2.13.10	BCL2.....	26
2.13.11	MYC	27
2.13.12	CD30.....	27
2.13.13	Ki67	28
2.13.14	İn Situ Hibridizasyon Yöntemi	28
2.14	Tümörün Mikroçevresi	28
2.14.1	Tümörü İnfiltrate Eden T lenfositler (TİL)	30
2.14.2	CD4, CD8 ve T lenfositler.....	30
2.14.3	Fork-Head Box P3 (FOXP3) ve CD4 Pozitif Regülatuar T Lenfositler (Treg) (Supresör T Hücreler).....	31
2.14.4	CD68, CD163 ve Tümör İlişkili Makrofajlar (TİM).....	33
2.15	Programmed Cell Death Protein-1 (PD-1) ve Programmed Death Ligand-1/2 (PD-L1/2) Yolağı	35
2.15.1	Lenfomalarda PD-1 ve PD-L1/ PD-L2 Yolağı.....	36
2.15.2	Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomada (DBBHL) PD-1 ve PD-L1/ PD-L2 Ekspresyonu	37
2.15.3	Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomada (DBBHL) PD-1 ve PD-L1/ PD-L2 Ekspresyonunun Prognoz İlişkisi	37
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1	DBBHL Olgularının Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri	39
3.2	Etik Kurul Onayı.....	39
3.3	Mikroskopik Değerlendirme	40
3.4	“Doku Mikroarray (DMA)” Tekniği ile Parafin Blokların Hazırlanması	40
3.5	PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68 ve CD163 İmmunhistokimyasal Belirteçlerinin Boyama Yöntemleri.....	41
3.6	İmmunhistokimyasal Belirteçlerin Değerlendirilmesi.....	44
3.7	Progresyon, Takip ve Sağkalım Verilerinin Değerlendirilmesi.....	45

3.8	Biyostatistiksel Analiz	46
4.	BULGULAR	47
4.1	Tanı Yaşı ve Cinsiyet.....	47
4.2	Tümörün Lokalizasyonu	48
4.3	Kemik İliği Tutulumu	50
4.4	Olguların Özgeçmişinde Saptanan Diğer Maligniteler.....	52
4.5	Serum LDH Düzeyi	52
4.6	Takip Süresi, Progresyon ve Sağkalım	53
4.7	CD10, BCL6 ve MUM1 İmmunhistokimyasal İncelemeleri İle Hans Algoritması ..	58
4.8	BCL2 ve MYC İmmunhistokimyasal İncelemeleri	60
4.9	Ki67 Proliferasyon İndeksi	62
4.10	EBER-CISH Yöntemi ile EBV Değerlendirmesi	63
4.11	Tümörde PD-L1 İmmunhistokimyasal İncelemesi.....	64
4.12	Tümör Mikroçevresinde PD-L1 İmmunhistokimyasal İncelemesi	68
4.13	Tümörde PD-1 immunhistokimyasal incelemesi.....	70
4.14	Tümör Mikroçevresinde PD-1 İmmunhistokimyasal İncelemesi.....	74
4.15	Tümör Mikroçevresinde FOXP3 İmmunhistokimyasal İncelemesi	77
4.16	Tümörde FOXP3 İmmunhistokimyasal İncelemesi	80
4.17	Tümör Mikroçevresinde CD4 ve CD8 İmmunhistokimyasal İncelemesi	84
4.18	Tümör Mikroçevresinde CD68 İmmunhistokimyasal İncelemesi.....	87
4.19	Tümör Mikroçevresinde CD163 İmmunhistokimyasal İncelemesi.....	91
4.20	İmmunhistokimyasal Yöntemle Yalnızca MYC pozitif, MYC ve BCL2 pozitif, MYC ve BCL2 ve BCL6 Pozitif Olguların Progresyon Açısından Değerlendirilmesi.....	95
5.	TARTIŞMA.....	96
6.	SONUÇLAR.....	105
7.	KAYNAKLAR.....	110

8. EKLER

8.1	ETİK KURUL ONAY BELGESİ.....	133
8.2	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU	135
8.3	OLGU RAPOR FORMU ÖRNEĞİ.....	139
8.4	TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU.....	141



ÖZET

Diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL), Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2016 sınıflamasında matür B hücreli neoplaziler grubunda yer almaktadır. Gelişmiş ülkelerde non-Hodgkin lenfomaların % 25-35'ini oluşturmaktadır. Standart kemoterapi rejimleri ile 5 yıllık sağkalım oranları %60-70'e ulaşmaktadır. Non-Hodgkin lenfoma olgularında aynı tedavi uygulanan hastalar arasında prognoz, oldukça değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle hem prognozu öngörmede, hem de hedefe yönelik tedaviler açısından biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Tümörler, neoplastik hücreler yanı sıra inflamatuvar hücreler, fibroblastlar, endotel hücreleri ve bu hücreler arasında salınan molekülleri içermektedir. Son dönemde yapılan çalışmalarda tümör mikroçevresinin kanser gelişimi ve progresyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir. DBBHL'lerde de, tümör mikroçevresinde yer alan neoplastik olmayan hücrelerin ve ekstrasellüler matriks bileşenlerinin prognostik öneme sahip olduğu bildirilmiş, immün sistem hücrelerinin ve eksprese ettikleri reseptörlerin ya da ligandların oluşturduğu tümör mikroçevresinin moleküler ve hücre yapısının tümör büyümesinde ve klinik progresyonda önemli olduğu ortaya konmuştur. Tümöre spesifik sitotoksik CD8 pozitif T lenfositlerin aktivasyonu anti-tümör immün yanıt oluştururken, CD4 pozitif ve bir transkripsiyon faktörü olan FOXP3 ile pozitif regülatuar T hücrelerin (Treg), myeloid-derive supresör hücrelerin ve immün kontrol noktasında etkili olan PD-1 ve PDL-1 gibi moleküllerin, CD8 pozitif T hücreler üzerinde inhibitör etkileri bulunmaktadır. CD68 pozitif tümör ilişkili makrofajların (TİM) büyüme faktörleri, sitokinler ve proteazlar üreterek tümör gelişimine ve progresyonuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Solid tümörlerde PD-1 ve PDL-1 blokajı yapan immunoterapi ajanları ile yapılan çalışmalarda elde edilen uzun dönem klinik sonuçlar nedeniyle anti-tümör immunité önem kazanmaktadır.

Çalışmamızda Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda, 2009-2016 yılları arasındaki arşiv kayıtlarına ait veriler değerlendirilerek, nodal ya da ektranodal lokalizasyonlu "diffüz büyük B hücreli lenfoma, spesifiye edilemeyen (NOS)" tanısı almış, parafin blok ve preparatlarına ulaşılabilen toplam 163 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Olguların tamamı arşivimizde bulunan CD3, CD20, BCL-2, BCL-6, MUM1, CD10, MYC, Ki67 immunhistokimyasal belirteçlerine ait preparatları ve EBER-CISH yöntemi ile EBV enfeksiyonunun varlığı açısından yeniden değerlendirildi. Tümörde ve tümör mikroçevresinde ekspresyon durumlarını değerlendirmek amacıyla

immunhistokimyasal yöntemle PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68 ve CD163 incelemeleri uygulandı.

Çalışmaya dahil edilen olguların tanı aldığı dönemdeki medyan yaşı 62 olup tanı yaşı aralıkları 13 ile 92 yaş arasında değişmektedir. Olguların 83'ü (%50,9) kadın, 80'i (%49,1) erkek olup, tümör lokalizasyonu açısından ele alındığında olguların 78'inde (%47,9) nodal tutulum, 85'inde (%52,1) ektranodal tutulum saptandı. Olguların arşivimizde evreleme amacıyla yapılmış kemik iliği biyopsisi bulunan 114 olgunun (%69,9) 20'sinde (%17,5) DBBHL infiltrasyonu saptandı. Çalışmada olguların medyan izlem süresi 81 ay (min-maks: 1-143 ay) olarak belirlendi. Çalışmaya dahil edilen 163 olgunun 40'ının (%24,5) öldüğü, 29'unda (%17,8) biyopsi ya da PET/BT ile saptanan hastalık progresyonu olduğu belirlendi. Olguların genel sağkalım medyan değeri 115,7±4,2 ay; progresyonsuz sağkalım medyan değeri 103,8±3,4 ay olarak saptandı. Olguların bir yıllık genel sağkalım oranı %92,4; üç yıllık genel sağkalım oranı %84,6 ve beş yıllık genel sağkalım oranı %80 olarak hesaplandı. Olguların bir yıllık progresyonsuz sağkalım oranı %87,3; üç yıllık progresyonsuz sağkalım oranı %77 ve beş yıllık progresyonsuz sağkalım oranı %73,1 olarak hesaplandı. Tanı yaşının artışının, genel sağkalım açısından 1,066 kat artmış riske sahip olduğu bulundu ($p<0,001$), progresyonsuz sağkalım açısından ise 1,036 kat artmış riske sahip olduğu belirlendi ($p=0,034$). Hans algoritmasına göre olguların 101 tanesi (%62) non-GCB/ABC, 62 tanesi (%38) GCB fenotipinde değerlendirildi.

Çalışmamızda hem prognostik farklılıkların öngörülmesinde, hem de immunmodülatör tedavilere uygun hastaların belirlenmesinde önemli rolü olan tümör mikroçevresini ve tümör hücrelerinde PD-1/PD-L1 ekspresyonunu değerlendirdik. Tümör hücrelerinde ve tümör mikroçevresinde PD-1/PD-L1 ekspresyonu ya da tümör mikroçevresini oluşturan hücreleri değerlendirmeye yönelik yaptığımız FOXP3, CD4, CD8, CD68 ve CD163 immunhistokimyasal belirteçleri ile sağkalım analizinde anlamlı ilişki saptamadık. Ancak prognostik öneme sahip olan Hans algoritması, kemik iliği tutulumu, serum LDH düzeyi, Ki67 proliferasyon indeksi gibi parametreler ile tümör hücrelerine ya da tümör mikroçevresine ait immunhistokimyasal özelliklere ait analizlerde istatistiksel anlamlı sonuçlar saptadık. Tümörde PD-L1 ekspresyonu saptanan hastaların %73,2'si Hans algoritmasına göre daha kötü prognostik olduğu bilinen ABC alt grubunda yer almaktaydı. Ayrıca tümörde PD-L1 ekspresyonu bulunan olgularda, prognostik olarak değerlendirilebilecek bir başka parametre olan Ki67 proliferasyon indeksi de anlamlı olarak daha yüksekti. İmmun kontrol noktası inhibitörlerinin hedefi olan PD-1, az sayıda olguda

tümörde pozitif saptanmış olmakla birlikte, boyanma oranının artışı ile progresyon oranı açısından 0,359 kat artan riske sahip olduğu belirlendi ($p<0,001$). PD-L1'in tümör mikroçevresinde pozitif saptandığı olgular ise anlamlı olarak daha sıklıkla GCB alt grubundaydı.

DBBHL olgularında neoplastik hücrede PD-L1 ekspresyonu ile sağkalım analizleri arasında ilişki saptanmamış olmakla birlikte Ki67 proliferasyon indeksi ve ABC tipi ilişkisi nedeniyle tümörde PD-L1 ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olabileceği düşünülebilir. Tümör mikroçevresinin ve tümör hücresi ile etkileşimlerinin detaylı olarak ortaya konması, yeni tedavi açılımlarının belirlenmesi ve yeni terapötik ajanların geliştirilmesi için ışık tutacaktır. Tümör, tümör mikroçevresi ve prognostik özellikler ile ilişkisinin net olarak ortaya konması için geniş olgu serilerinde yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: PD-1, PD-L1, diffüz büyük B hücreli lenfoma, tümör mikroçevresi, prognoz

ABSTRACT

Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL), is classified in mature B cell neoplasms according to WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. DLBCL, not otherwise specified (NOS), constitutes 25-35% of adult non-Hodgkin lymphomas in developed countries. The 5 year overall survival is approximately 60-70% with standard chemotherapy regimens. The prognosis of DLBCL patients varies even with the same treatment protocols. Therefore, biomarkers are needed for predicting prognosis and for targeted therapies. Tumors include neoplastic cells as well as inflammatory cells, fibroblasts, endothelial cells and molecules released between these cells. Recent studies have shown that tumor microenvironment plays an important role in cancer development and progression. Likewise in DLBCL, non-neoplastic cells and extracellular matrix components in the tumor microenvironment have been reported to have prognostic significance. The molecular and cellular structure of the immune system cells and the tumor microenvironment formed by the receptors or ligands they express have been shown to be important in tumor growth and clinical progression in DLBCL. Activation of tumor-specific cytotoxic CD8 positive T lymphocytes produces an anti-tumor immune response. CD4 positive and FOXP3 positive regulatory T cells (Treg), myeloid-derived suppressor cells and molecules such as PD-1 and PDL-1, which are effective at the immune control point, have positive inhibitory effects on CD8 positive T cells. CD68 positive tumor-associated macrophages (TAM) have been reported to contribute to tumor growth and progression by producing growth factors, cytokines, and proteases. Anti-tumor immunity gains importance due to the long-term clinical results obtained from studies with immunotherapy agents that block PD-1 and PD-L1 in solid tumors.

In our study, the data of the archival records between the years of 2009-2016 were evaluated in the Department of Pathology, Ege University Faculty of Medicine Hospital. A total of 163 cases, diagnosed as diffuse large B cell lymphoma, NOS were included in the study. All of the cases were re-evaluated for the slides of CD3, CD20, BCL-2, BCL-6, MUM1, CD10, MYC, Ki67 immunohistochemical markers and presence of EBV infection by EBER-CISH method that were in our archive. Immunohistochemical stainings of PD-L1, PD-

1, FOXP3, CD4, CD8, CD68 and CD163 were performed to evaluate the expression status of tumor and tumor microenvironment.

The median age of the subjects included in the study at the time of diagnosis was 62 years (minimum;13- maximum; 92). Eighty-three (50.9%) of the patients were female and 80 (49.1%) were male. Nodal involvement was found in 78 (47.9%) and extranodal involvement was found in 85 (52.1%) of the cases. DLBCL infiltration in bone marrow was detected in 20 (17.5%) of 114 cases (69.9%) who had bone marrow biopsy performed in our archive. The median follow-up period was 81 months (minimum;1- maximum; 143). Forty of them (24.5%) died and 29 of them (17.8%) had disease progression detected by biopsy or PET / CT. The median overall survival was 115.7 ± 4.2 months. The median value of progression-free survival was 103.8 ± 3.4 months. One-year overall survival rate was 92.4%; three-years overall survival rate was 84.6% and the five-years overall survival rate was 80%. One-year progression-free survival was 87.3%; three-years progression-free survival rate was 77% and the five-years progression-free survival rate was 73.1%. The increase in the age at the time of diagnosis was found to have a 1.066-fold increased risk for overall survival ($p < 0.001$), and a 1.036-fold increased risk for progression-free survival ($p = 0.034$). According to Hans algorithm, 101 (62%) of the cases were evaluated in non-GCB / ABC and 62 (38%) were in GCB phenotype.

In our study, we evaluated tumor microenvironment and PD-1 / PD-L1 expression in tumor cells, which play an important role both in predicting prognostic differences and in identifying patients suitable for immunomodulatory therapies. We did not find a significant correlation in the survival analysis with the FOXP3, CD4, CD8, CD68, CD163 and PD-1/PD-L1 expressions in tumor microenvironment cells or tumor cells. However, we found statistically significant results in the analysis of the prognostic significance of the Hans algorithm, bone marrow involvement, serum LDH level, Ki67 proliferation index, and immunohistochemical properties of tumor cells or tumor microenvironment. 73.2% of patients with PD-L1 expression in the tumor were in the ABC subgroup, which is known to have a worse prognosis than GCB subgroup. In addition, Ki67 proliferation index, another parameter that can be evaluated prognostically, was significantly higher in patients with PD-L1 expression in the tumor. Although PD-1, which is the target of immune control point inhibitors, was found to be positive in a small number of tumors, it was found that the risk of progression was increased by 0.359 times with increasing expression rate ($p < 0.001$). Patients

with PD-L1 positivity in the tumor microenvironment were significantly more often in the GCB subgroup.

Although PD-L1 expression in neoplastic cells was not correlated with survival analysis in DLBCL cases, PD-L1 expression in neoplastic cells may be associated with poor prognosis due to Ki67 proliferation index and ABC type relationship. A detailed understanding of tumor microenvironment and tumor cell interactions will shed light on identifying new therapeutic expansions and developing new therapeutic agents. In order to establish the relationship between tumor, tumor microenvironment and prognostic features, studies in large case series are needed.

Key words: PD-1, PD-L1, diffuse large B cell lymphoma, tumor microenvironment, prognosis



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Ann Arbor Evrelemesi	7
Tablo 2: Uluslararası Prognostik İndeks (IPI) (152)	18
Tablo 3: IPI Risk kategorileri (152)	18
Tablo 4: Tümörde ve mikroçevresinde PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68, CD163 ekspresyonu ile cinsiyet arasındaki ilişki	48
Tablo 5: DBBHL olgularının nodal ve ektranodal tutulum bölgelerinin sayısı ve oranı	49
Tablo 6: Tümörde ve mikroçevresinde PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68, CD163 ekspresyonu ile tutulum bölgesi arasındaki ilişki	50
Tablo 7: Tümörde ve mikroçevresinde PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68, CD163 ekspresyonu ile kemik iliği tutulumu arasındaki ilişki	51
Tablo 8: Tümörde ve mikroçevresinde PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68, CD163 ekspresyonu ile serum LDH düzeyi arasındaki ilişki	53
Tablo 9: Tanı yaşı ile sağkalım ilişkisi	56
Tablo 10: Klinik ve patolojik parametreler ile sağkalım ilişkisi	56
Tablo 11: Tümörde FOXP3 ekspresyonu bulunan olguların sağkalım analizi	57
Tablo 12: Tümörde PD-L1 ekspresyonu, tümör mikroçevresinde PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68, CD163 ekspresyonu, Ki67 proliferasyon indeksi ile sağkalım arasındaki ilişki	57
Tablo 13: Olguların CD10, MUM1 ve BC6 ekspresyon durumu	58
Tablo 14: Tanı yaşı, Ki67 proliferasyon indeksi, serum LDH düzeyi ile Hans algoritması ilişkisi	58
Tablo 15: Tümörde ve mikroçevrede PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68, CD163 ekspresyonu ile CD10, BCL6, MUM1, Hans Algoritması arasındaki ilişki	59

Tablo 16: Tümörde ve tümör mikroçevresinde PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8 CD68, CD163 ekspresyonu ile BCL2 ve MYC ekspresyonu arasındaki ilişki	61
Tablo 17: Tümörde ve tümör mikroçevresinde PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68, CD163 ekspresyonu ile Ki67 proliferasyon indeksi arasındaki ilişki.....	63
Tablo 18: PD-L1 ekspresyonu gösteren olgu sayısı ve oranı	64
Tablo 19: Tümörde ve Tümör Mikroçevresinde PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68 CD163 ekspresyonu; Tümör Mikroçevresinde PD-L1 Ekspresyonu ile Tümörde PD-L1 Ekspresyonu Arasındaki İlişki	67
Tablo 20: Tümörde ve tümör mikroçevresinde PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68 CD163 ekspresyonu; Tümörde PD-L1 ekspresyonu ile tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki	69
Tablo 21: PD-1 ekspresyonu gösteren olgu sayısı ve oranı.....	72
Tablo 22: Tümörde ve tümör mikroçevresinde PD-L1, FOXP3, CD4, CD8, CD68 CD163 ekspresyonu; tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyonu ile tümörde PD-1 ekspresyonu arasındaki ilişki	73
Tablo 23: Tümörde ve tümör mikroçevresinde PD-L1, FOXP3, CD4, CD8, CD68 CD163 ekspresyonu; tümörde PD-1 ekspresyonu ile tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyonu arasındaki ilişki	76
Tablo 24: FOXP3 ekspresyonu gösteren olgu sayısı ve oranı.....	77
Tablo 25: Tümörde ve tümör mikroçevresinde PD-L1, PD-1, CD4, CD8, CD68 CD163 ekspresyonu ile tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyonu arasındaki ilişki.....	79
Tablo 26: Tümörde ve tümör mikroçevresinde PD-L1, PD-1, CD4, CD8 CD68 CD163 ekspresyonu; tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyonu ile tümörde FOXP3 ekspresyonu arasındaki ilişki.....	83
Tablo 27: Tümör mikroçevresinde CD4 ve CD8 pozitif hücre oranı.....	84
Tablo 28: Tümörde ve mikroçevresinde PD-L1, PD-1 FOXP3, CD68 CD163 ekspresyonu ile tümör mikroçevresinde CD4 ve CD8 ekspresyonu arasındaki ilişki.....	86

Tablo 29: Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyonu gösteren hücre sayısı ve oranı	88
Tablo 30: Tümörde ve mikroçevresinde PD-L1, PD-1 FOXP3, CD4, CD8, CD163 ekspresyonu ile tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyonu arasındaki ilişki	90
Tablo 31: Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyonu.....	92
Tablo 32: Tümörde ve mikroçevresinde PD-L1, PD-1 FOXP3, CD4, CD8, CD68 ekspresyonu ile Tümör Mikroçevresinde CD163 Ekspresyonu Arasındaki İlişki	94



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Matür B hücreli neoplaziler.....	5
Şekil 2: Hans Algoritması (6).....	13
Şekil 3: Diffüz büyük B hücreli lenfomaların köken aldığı hücre tipi (79)	14
Şekil 4: İmmunoterapi için hedef moleküller	38
Şekil 5: Doku "mikroarray" yöntemi ile hazırlanan bloklar ve immunhistokimyasal belirteçlere ait preparatlar.....	41
Şekil 6: Çalışmaya dahil edilen olguların kadın ve erkek oranı	47
Şekil 7: Tutulum bölgesine göre olgu sayısı ve oranları	49
Şekil 8: Kemik iliği biyopsisi bulunan olgular	50
Şekil 9: Kemik iliği tutulumu bulunan olgu sayısı ve oranı	51
Şekil 10: Kaplan- Meier genel sağkalım analizi.....	54
Şekil 11: Kaplan-Meier progresyonsuz sağkalım analizi	55
Şekil 12: Olguların Hans Algoritmasına göre sayısı ve oranı	60
Şekil 13: Olguların Ki67 proliferasyon indeksi dağılımı	62
Şekil 14: MYC, BCL2 ve BCL6 immunhistokimyasal belirteçlerinin ekspresyon oranı.....	95

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: A. Mide yerleşimli DBBHL (H&E; 5x) B. Mide yerleşimli DBBHL (H&E; 20x)	8
Resim 2: Lenf nodunda DBBHL ve santroblastik morfoloji (H&E, 20x).....	9
Resim 3: İntraabdominal kitle, DBBHL ve anaplastik varyant (H&E; 40x).....	10
Resim 4: A. Tümörde PD-L1 ekspresyonu (DAB; 5x) B. Tümörde PD-L1 ekspresyonu (DAB;40x)	64
Resim 5: Lenf nodunda iki olguda tümörde PD-1 ekspresyonu (DAB;10x)	71
Resim 6. A. Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyonu (DAB; 2,5x), B. Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyonu (DAB; 10x)	74
Resim 7:A. Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyonu (DAB;5x), B. . Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyonu (DAB;20x).....	78
Resim 8: A. Tümörde FOXP3 ekspresyonu (DAB; 5x), B. Tümörde FOXP3 ekspresyonu (DAB; 40x)	81
Resim 9: A.Tümör mikroçevresinde CD4 pozitif T lenfositler (DAB; 5x) B. Tümör mikroçevresinde CD8 pozitif T lenfositler (DAB; 5x).....	87
Resim 10: A. Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyonu (DAB;5x), B.Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyonu (DAB; 20X)	89
Resim 11: A. Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyonu (DAB;5x), B.Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyonu (DAB; 20x)	92

KISALTMALAR LİSTESİ

DBBHL	: Diffüz büyük B hücreli lenfoma
MALT lenfoma	: Mukoza ilişkili lenfoid dokunun ektranodal marjinal zon lenfoması
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
GCB	: Germinal merkez B hücre
ABC	: Aktive B hücre
NOS	: Spesifiye edilemeyen
IG	: İmmünglobulin
IPI	: Uluslararası prognostik indeks
CALLA	: Akut lenfoblastik lösemi antijeni
TNF	: Tümör nekroz faktör
ISH	: İn situ hibridizasyon
FISH	: Floresan in situ hibridizasyon
CISH	: Kromojenik İn situ hibridizasyon
H&E	: Hematoksilen ve eozin
TİL	: Tümörü infiltre eden lenfositler
TİM	: Tümör ilişkili makrofajlar
MHC	: Majör doku uygunluk kompleksi
Treg	: Regülatuar T hücre
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
FDG-PET/BT	: Flor-18 işaretli florodeoksiglukoz (F-18 FDG) ile pozitron emisyon tomografisi/bilgisayarlı tomografi

1. GİRİŞ

Diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL), Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2016 sınıflamasında matür B hücreli neoplaziler grubunda yer almaktadır (1). Gelişmiş ülkelerde non-Hodgkin lenfomaların %25-35'ini oluşturmaktadır. Standart kemoterapi rejimleri ile 5 yıllık sağkalım oranları %60-70'e ulaşmaktadır (2). Günümüzde prognozu belirlemede Ann Arbor evreleme sistemi ve Uluslararası Prognostik İndeks (IPI) kullanılmaktadır (3). Non-Hodgkin lenfoma olgularında aynı tedavi uygulanan hastalar arasında prognoz, oldukça değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle hem prognozu öngörmeye hem de hedefe yönelik tedaviler açısından biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır (4). DBBHL olgularının bir kısmı morfolojik, biyolojik ve klinik çalışmalar sonucunda çeşitli morfolojik varyantlar ve moleküler alt gruplara ayrılmış olmakla birlikte, olguların bir kısmı bu alt gruplara uygun özellikleri karşılamamakta ve "DBBHL, spesifiye edilemeyen (NOS)" olarak değerlendirilmektedir. DBBHL, NOS olguları, köken aldıkları hücreye göre geliştirilmiş Hans algoritması uygulanarak germinal merkez B hücre (GCB) alt tipi ve aktive B hücre (ABC) alt tipi olarak moleküler alt gruplara ayrılmaktadır (5).

Morfolojik olarak tümör hücrelerinin nükleus boyutu, normal bir makrofaj ile eşit boyutta ya da daha büyük, hücre boyutu ise normal bir lenfositin iki katı ya da daha büyük olan, orta- büyük boy lenfoid hücrelerden oluşur ve diffüz bir büyüme paternine sahiptir (5). DBBHL, NOS morfolojik olarak santroblastik, immunoblastik, anaplastik ve diğer nadir varyantlar olmak üzere alt gruplara ayrılır (5,6). İmmunhistokimyasal olarak tümör hücreleri genellikle pan-B belirteçler olan CD19, CD20, CD22, CD79a ve PAX5 ile pozitif olmakla birlikte, bazen bu belirteçlerin birinde veya birden fazlasında negatiflik görülebilir. Yüzey ve sitoplazmik immunglobulinler (en sık IgM ve sırası ile IgG ve IgA) olguların %50-75'inde eksprese edilir. CD30 pozitifliği olguların %10-20'sinde görülebilmekle birlikte bu durum sıklıkla anaplastik varyantta gözlenmektedir (7,8). MYC ve BCL2 ekspresyonu değişken oranlarda izlenmektedir (5). BCL2 ve MYC ekspresyonunun değerlendirilmesinde pozitif tümör hücrelerinin oranı belirlenmekte ve çoğu çalışmada kabul edilen eşik değerler; BCL2 için %50 ve üzerinde, MYC için %40 ve üzerinde pozitiflik şeklindedir (9,10). CD10, BCL6, IRF4/MUM1, FOXP1, GCET1 ve LM02 ekspresyon oranları literatürde değişkenlik göstermektedir (5). Hans algoritmasında uygulanan immunhistokimyasal belirteçler olan

CD10, BCL6 ve IRF4/MUM1 tümör hücrelerinin % 30'unda veya daha fazlasında eksprese edilmesi durumunda pozitif olarak değerlendirilmektedir (11). Ki67 proliferasyon indeksi genellikle %40'ın üzerinde olmakla birlikte olguların bir kısmında %90'ın üzerinde saptanabilmektedir (12–14).

Tümörler, neoplastik hücreler yanı sıra inflamatuvar hücreler, fibroblastlar, endotel hücreleri ve bu hücreler arasında salınan molekülleri içermektedir (15). Son dönemde yapılan çalışmalarda tümör mikroçevresinin kanser gelişimi ve progresyonunda önemli etkisi olduğu gösterilmiştir (16). Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda DBBHL'lerde de, tümör mikroçevresinde yer alan neoplastik olmayan hücrelerin ve ekstrasellüler matriks bileşenlerinin prognostik öneme sahip olduğu bildirilmiştir (17). Majör doku uygunluk kompleksi (MHC) sınıf II moleküllerinin kaybının tümörü infiltre eden CD8 pozitif T hücrelerinin azalması ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (18). İmmün kaçış mekanizmaları da benzer şekilde önemli onkojenik etkiye sahiptir (5).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda immün sistem hücrelerinin ve eksprese ettikleri reseptörlerin ya da ligandların oluşturduğu tümör mikroçevresinin moleküler ve hücre yapısının tümör büyümesinde ve klinik progresyonda önemli olduğu ortaya konmuştur (19).

Tümör hücreleri tarafından indüklenen immunsupresyon ile T hücrelerin sitotoksitesinde azalma, regülatuar T hücre (Treg) gibi immunsupresif T hücrelerde artış, sitotoksik T-lenfosit ilişkili antijen-4 (CTLA-4), “Programmed cell death protein 1 “ (PD-1) ve “Programmed Cell Death Ligand 1” (PD-L1) gibi inhibitör modülatör moleküllerin ekspresyonunda artış olmaktadır. Bu sebeple tümör mikroçevresinde immunmodülatör faktörlerin ve tümörü infiltre eden T lenfosit (TİL) benzeri immün sistem hücrelerinin durumunun belirlenmesi solid tümörler yanı sıra lenfomalarda da prognozu öngörmede etkili olmaktadır. Tümöre spesifik sitotoksik CD8 pozitif T lenfositlerin aktivasyonu anti-tümör immun yanıt oluştururken, CD4 pozitif ve bir transkripsiyon faktörü olan FOXP3 ile pozitif regülatuar T hücrelerin (Treg), myeloid-derive supresör hücrelerin ve immun kontrol noktasında etkili olan PD-1 ve PD-L1 gibi moleküllerin CD8 pozitif T hücreler üzerinde inhibitör etkileri bulunmaktadır (20–22).

CD68 pozitif tümör ilişkili makrofajların (TİM) büyüme faktörleri, sitokinler ve proteazlar üreterek tümör gelişimine ve progresyonuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir (23). Makrofajlar ise fenotipik ve fonksiyonel açıdan farklı M1 ve M2 olarak adlandırılan iki seri olarak diferansiye olmaktadır. M1 makrofajlar proinflamatuvar sitokin üretimi yanı sıra

patojenlere karşı primer efektör hücre fonksiyonuna sahiptir. Aynı zamanda tümör supresyonu ve anti-tümör immun yanıtın stimülasyonunda etkilidir. M2 makrofajlar CD163 ve CD204 eksprese ederler ve M1 makrofajların aksine tümör hücresinin devamlılığı, invazyonu, metastazı ve anjiogenezde promotör role sahiptir. M2 makrofajlar, M1 makrofajların ve Th1 hücrelerin antitümör immun etkisinin inhibisyonu yanı sıra Treg ve Th2 hücrelerin aktivasyonunda etkilidir (24). Treg hücrelerin solid tümörlerde anti-tümör aktivitenin etkisini azalttığı ve tümör progresyonu yanı sıra kötü prognozla ilişkili olduğu bilinmektedir (25). Ancak pek çok lenfoid malignitede tümörü infiltre eden Treg hücre artışının iyi prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (26). Literatürde bir çalışmada, kombine immunokemoterapi ile tedavi edilen DBBHL olgularında artmış CD163 eksprese eden hücre sayısının ve CD163/CD68 eksprese eden hücre oranının kötü prognozu öngörmede etkili olduğu gösterilmiştir (27).

“Programmed cell death 1” (PD-1 ya da CD279), CD28 ve CTLA-4 immunoglobulin süper ailesinin bir üyesidir ve B7 ailesinin ligandları olan PD-L1 (CD274 ya da B7-H1) ve PD-L2 (CD273 ya da B7-DC) ile bağlanır. PD-1 aktive T hücreler, B hücreler, doğal öldürücü hücreler ve tümörü infiltre eden lenfositlerin (TİL) büyük bir kısmında eksprese edilir (28). PD-L1, PD-1 reseptörüne bağlanarak sitokin üretimini ve T hücrelerinin hücre siklusunda ilerlemesini inhibe etmektedir (29,30). PD-1 ve PD-L1 etkileşimi T hücre aracılı immün yanıt mekanizmasında önemli bir kontrol noktası görevine sahiptir (31). Pek çok tümörde T hücre aracılı immün yanıtın kaçış için PD-L1 aşırı ekspresyonunun bulunduğu gösterilmiştir (32–34). Literatürde DBBHL olgularında PD-L1 ekspresyonu %20-30 dolayında bildirilmiş olmakla birlikte, pozitiflik için kabul edilen eşik değerlerin farklı olması ve tümör hücreleri yanı sıra tümör mikroçevresinde bulunan diğer hücrelerde de eksprese edilmesi sebebi ile bildirilen pozitiflik oranları oldukça değişkendir (30). Solid tümörlerde PD-1 ve PD-L1 blokağı yapan immunoterapi ajanları ile yapılan çalışmalarda elde edilen uzun dönem klinik sonuçlar sebebi ile anti-tümör immunite önem kazanmaktadır (35,36).

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma

Hematopoietik sistem ana görevi hematopoez olan, çok sayıda organ ve dokuyu kapsayan kompleks bir sistemdir. Kemik iliği ve timus santral hematolenfoid organları; dalak, lenf nodları, tonsil ve ektranodal lenfoid dokular ise periferik hematolenfoid organları oluşturmaktadır (37).

Non-Hodgkin lenfomalar diferansiyasyon derecesine, histolojik arşitektüre, hücre boyutuna, klinik verilere ve immunhistokimyasal özelliklerine göre çok sayıda histolojik ve fenotipik alt tiplere ayrılmıştır. Matür B lenfositlerin klonal proliferasyonu ile karakterize olan matür B hücreli neoplaziler en sık görülen B hücreli lenfoma grubunu oluşturmaktadır (Şekil 1) (1).

DBBHL en sık görülen ve agresif klinik davranışa sahip non-Hodgkin lenfoma alt grubunu oluşturmaktadır (1,37). DBBHL'lerde, nükleusu normal bir makrofaj ile aynı boyutta ya da daha büyük veya normal bir lenfositin en az iki katı boyutta olan orta-büyük boy B lenfositlerin diffüz büyüme paterninde gelişimi söz konusudur. DBBHL'ler klinik, biyolojik ve morfolojik çalışmalar ışığında morfolojik varyantlar, moleküler alt tiplere ve farklı antitelere ayrılmıştır (Şekil 1) (1). Ancak klinik prezentasyon, genetik bulgular, tedavi yanıtı ve prognoz açısından oldukça heterojen olan ve alt tiplere ayırmak için yeterli ve kabul gören kriterlere sahip olmayan olgular DBBHL, NOS olarak adlandırılmakta olup bu olgular tablo 1'de yer alan spesifik tanısal kategorilerde değerlendirilememektedir (1,2).

DBBHL, spesifiye edilemeyen	Büyük B hücrelerden oluşan diğer lenfomalar	Yüksek dereceli B hücreli lenfoma	Sınıflanamayan B hücreli lenfoma
<ul style="list-style-type: none"> Morfolojik varyantlar; Sentroblastik İmmunoblastik Anaplastik Diğer nadir Moleküler subtipler; Germinal merkez B hücre-alttip Aktive B hücre alt tip 	<ul style="list-style-type: none"> T hücre/ histiyositten zengin büyük B hücreli lenfoma Santral sinir sisteminin primer diffüz büyük B hücreli lenfoması Primer kütanöz diffüz büyük B hücreli lenfoma, bacak tipi EBV-pozitif DBBHL, NOS Kronik inflamasyon ilişkili DBBHL Lenfomatoid granülomatozis IRF4 rearanjmanı ile birlikte BBHL Primer mediastinel (timik) büyük B hücreli lenfoma İntravasküler büyük B hücreli lenfoma ALK pozitif büyük B hücreli lenfoma Plazmablastik lenfoma HHV-8 pozitif DBBHL Primer efüzyon lenfoması 	<ul style="list-style-type: none"> MYC, bcl-2 ve/veya bcl-6 rearanjmanı ile birlikte yüksek dereceli B hücreli lenfoma Yüksek dereceli B hücreli lenfoma, NOS 	<ul style="list-style-type: none"> B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classic Hodgkin lymphoma

Şekil 1: Matür B hücreli neoplaziler

2.2 Epidemiyolojik Veriler

DBBHL, NOS grubunda yer alan olgular gelişmiş ülkelerde, erişkinlerde non-Hodgkin lenfomaların %25-35'ini oluşturmaktadır olup bu oran gelişmekte olan ülkelerde daha yüksek olarak bildirilmiştir. İleri yaş grubundaki hastalarda daha sık görülmektedir. DBBHL'lerin ortalama görülme yaşı 7.dekad olmakla birlikte çocuk ve genç erişkinlerde de görülebilmektedir. Erkeklerde kadınlardan hafifçe artmış oranlarda izlenmektedir (1). SEER veritabanında 2012-2016 yılları arasında elde edilen veriler ışığında, yıllık insidansı erkek hastalarda 5.6/100.000, kadın hastalarda 1.8/100.000 olarak belirtilmiştir (38).

2.3 Etiyoloji

DBBHL, NOS'un etiyojisi halen net olarak bilinmemektedir. Bu tümörler genellikle *de novo* (primer) olarak gelişim göstermekle birlikte daha az agresif bir lenfomadan DBBHL'ye transformasyon sonucunda sekonder olarak da gelişim izlenmektedir. Hastada immünyetmezlik durumunun bulunması bir risk faktörüdür. İmmünyetmezlik zemininde gelişen DBBHL, NOS olgularında Epstein-Barr virüs (EBV) pozitifliği sporadik olgulardan daha sık olarak bildirilmiştir. Aşık immünyetmezliği bulunmayan DBBHL olgularında EBV

enfeksiyonunun oranı Batı toplumlarında %3 dolayında, Asya ve Latin Amerika kökenli hastalarda %10 dolayında olup olgular genellikle Hans Algoritmasına göre uyarlandığında ABC fenotipindedir. Tümör hücrelerinin çoğunda EBV pozitifliği saptanması durumunda “EBV pozitif DBBHL, NOS” ya da diğer EBV pozitif spesifik lenfoma alt tipleri yönünde (kronik inflamasyon ilişkili DBBHL ya da lenfomatoid granülomatosis gibi) değerlendirilmesi önerilmektedir (1)

Ayrıca literatürde ultraviyole ışın, radyasyon, pestisitler ve saç boylarının DBBHL’lerin gelişiminde yüksek risk oluşturduğunu belirten yayınlar mevcuttur. İmmünyüpresyon ve “human immunodeficiency virüs” (HIV) enfeksiyonunun da risk faktörü olduğu ve EBV enfeksiyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (39).

2.4 Tümörün Lokalizasyonu

Olgularda tanı anında nodal ya da ektranodal tutulum görülebilmekle birlikte %40’ında ektranodal tutulum ile prezentasyon bildirilmiştir (40,41). Gastrointestinal traktus (mide ve ileoçekal bölge) en sık ektranodal tutulum bölgesi olmakla birlikte herhangi bir ektranodal lokalizasyonda görülebilmektedir. Diğer sık görülen ektranodal tutulum bölgeleri arasında kemik, testis, dalak, Waldeyer halkası, tükürük bezleri, tiroid, karaciğer, böbrekler ve adrenal bez yer almaktadır. Böbrek ve adrenal gland tutulumu ile tanı alan DBBHL olgularında santral sinir sistemi (SSS) yayılımı riskinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Büyük B lenfositlerle karakterli kutanöz follikül merkez hücreli lenfoma ya da primer kutanöz DBBHL bacak tipi gibi kutanöz lenfomalar ise farklı antiteler olarak kabul görmektedir (1). DBBHL olgularında kemik iliği tutulumu varlığında, olguların %10-25’inde kemik iliğinde düşük dereceli B hücreli lenfoma morfolojisinde infiltrasyon saptandığı bildirilmiş olup diskordan hastalık olarak değerlendirilmektedir. Kemik iliğinde büyük B hücrelerden oluşan infiltrasyon durumunda ise konkordan hastalık şeklinde kabul edilmektedir (42–45). Flow sitometri, immunhistokimya ya da moleküler genetik testler yardımı ile kemik iliğinde minimal infiltrasyonların belirlenme oranı artırılabilir (1). Son yıllarda yapılan çalışmalarda FDG-PET/BT görüntüleme yönteminin konkordan hastalık durumunda kemik iliği infiltrasyonunu belirlemede sensitif bir yöntem olduğu, ancak diskordan hastalık için sensitivitesinin düşük olduğu bildirilmiştir (45,46). Lenfoma evrelemede en güncel konsensus kriterlerinde FDG-PET/BT’de tutulum olmaması durumunda evreleme için kemik

iliği biyopsisinin gerekli olmadığı belirtilmiştir. Periferik kanda DBBHL tutulumu nadir olarak saptanmaktadır (1).

2.5 Klinik Özellikler

Hastalar genellikle tek ya da multipl, hızlı büyüyen, nodal veya ektranodal kitle şikayeti ile kliniğe başvururlar. Hastaların yaklaşık yarısı Ann Arbor evreleme sistemine göre erken evre hastalık döneminde (Evre I ya da Evre II) tanı almaktadır (1). FDG-PET/BT tarama yönteminin kullanımı ile DBBHL hastalarının %10-20'sinin daha ileri evrede (Evre III ve Evre IV) olduğu, hastaların %10'undan azının ise daha düşük evrede olduğu ya da tedavide değişikliğe sebep olduğu bildirilmiştir (47). Hastalar genelde asemptomatik olmakla birlikte ateş, gece terlemesi ve kilo kaybı gibi B semptomları da görülebilmektedir. Ektranodal tutulum varlığında tutulumun lokalizasyonuna göre daha spesifik semptomlar da gelişebilmektedir (1).

Tablo 1: Ann Arbor Evrelemesi

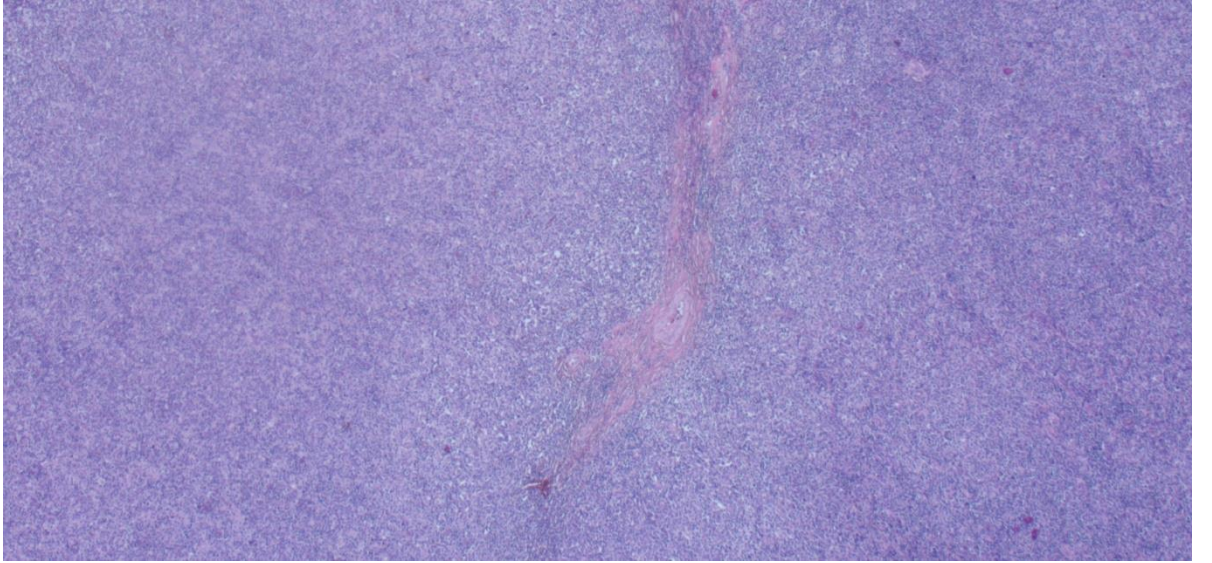
Evre	Özellikler
I	Tek bir lenf nodu bölgesi veya tek bir ektranodal organ tutulumu (IE)
II	Diafragmanın bir tarafında 2 ya da daha fazla lenf nodu bölgesi tutulumu, ektranodal organ ve bir ya da daha fazla lenf nodu bölgesi tutulumu. (IIE)
III	Diafragmanın her iki tarafında lenf nodu bölgesi tutulumu ve bunlara eşlik edebilen ektranodal organ (IIIE) ya da dalak (IIIS) ya da her ikisinin tutulumu (IIISE)
IV	Bir ya da daha fazla uzak ektranodal organın diffüz veya yaygın tutulumu

A, sistemik belirti yok; B, sistemik belirti var; E, ektranodal tutulum; S, dalak tutulumu; X, "bulky" hastalık; B semptomları: $\geq 38^{\circ}$ ateş, gece terlemesi, son 6 ay içerisinde vücut ağırlığının %10'undan fazlasının kaybı

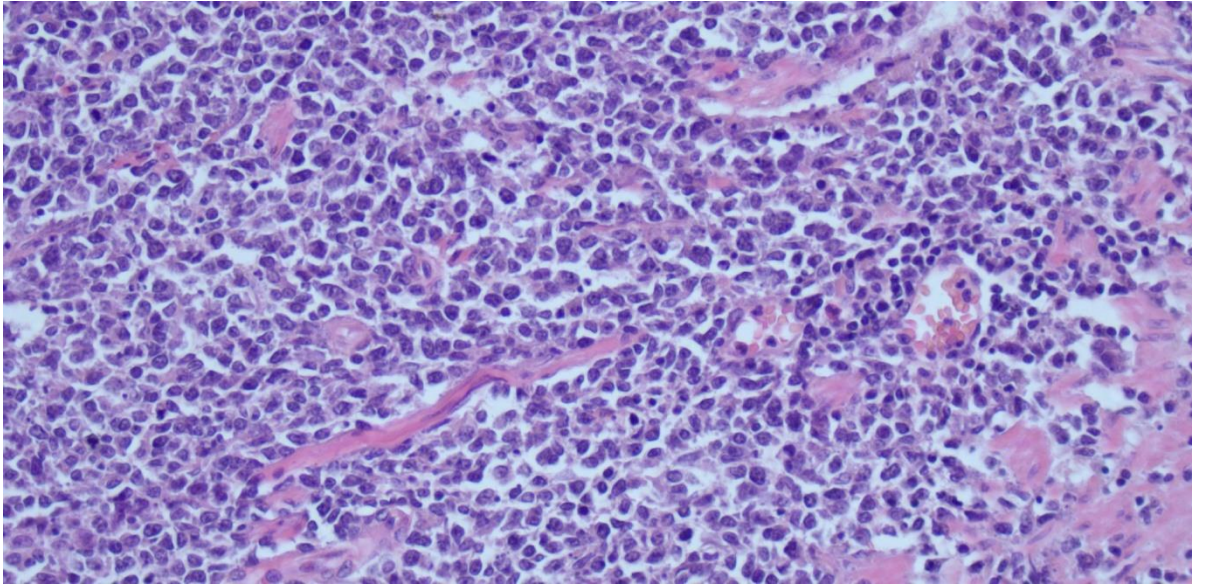
2.6 Mikroskopik Özellikler

Lenf nodunun olağan arşitektürel yapısını parsiyel ya da sıklıkla total olarak ortadan kaldıran, orta- büyük boy lenfoid hücrelerin oluşturduğu diffüz infiltrasyon mevcuttur. Parsiyel nodal tutulum varlığında interfolliküler infiltrasyona daha az sıklıkta sinüzoidal

tutulum eşlik etmektedir. Perinodal doku genellikle infiltrate görünümündedir. Geniş veya ince skleroz alanları izlenebilmektedir. DBBHL, NOS'larda görülen morfolojik bulgular, olgular arasında çeşitlilik göstermekte olup, morfolojik bulgulara göre sık ve nadir görülen morfolojik varyantlar mevcuttur. Orta boy lenfoid hücrelerin oluşturduğu infiltrasyonlar, olguların yanlış sınıflandırılmasına sebep olabilmektedir. Bu hastalarda ekstramedüller lösemiler, Burkitt lenfoma, "MYC ve BCL2 ve/veya BCL6 rearanjmanı gösteren yüksek dereceli B hücreli lenfoma", blastoid mantle hücreli lenfoma olgularına yönelik ayırıcı tanının yapılabilmesi amacıyla ile spesifik tanısal yardımcı yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (1)



A



B

Resim 1: A. Mide yerleşimli DBBHL (H&E; 5x) **B.** Mide yerleşimli DBBHL (H&E; 20x)

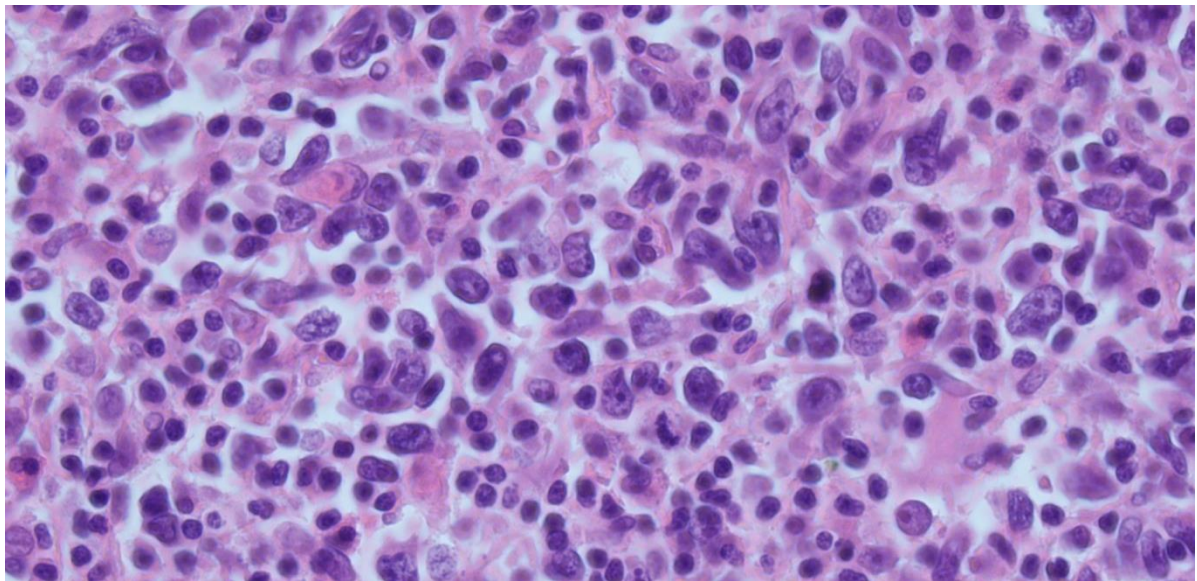
2.7 Morfolojik Varyantlar

2.7.1 Sık Görülen Morfolojik Varyantlar

Santroblastik varyant, immunoblastik varyant ve anaplastik varyant sık görülen morfolojik varyantlardır. Tüm morfolojik varyantlarda neoplastik hücelere T hücelere yanı sıra histiyositler eşlik edebilmektedir. Bu olgularda T hücre/ histiyositten zengin büyük B hücreli lenfoma yönünde bir değerlendirme yapmadan önce bu antitenin tanısı için gerekli olan tüm kriterlerin karşılanması gerekmektedir.

2.7.2 Santroblastik Varyant

En sık görülen morfolojik varyanttır. Santroblastlar, oval-yuvarlak, ince kromatinli veziküle nükleusa sahip orta-büyük boy lenfoid hücre morfolojisindedir. Santroblastta nükleer membrana bağlı 2-4 adet nükleol bulunur. Bu hücelere amfofilik ya da bazofilik dar sitoplazmaya sahiptir. Olguların bir kısmında tümörün tamamına yakını (tümör hücelereinin %90'ından fazlası) santroblastik morfolojide ve monomorfik görünümündedir (1). Ancak olguların çoğu santroblastlar yanı sıra tümör hücelereinin %90'ından azını oluşturan immunoblast morfolojisindeki hücelereleden oluşan polimorfik bir infiltrasyona sahiptir (48,49). Tümör hücelereinde multilobe nükleuslar izlenebilmekle birlikte, kemik ya da diğere ektranodal bölgelere lokalize olgularda multilobe nükleuslu hücelere infiltrasyonun büyük kısmını oluşturabilir (1).



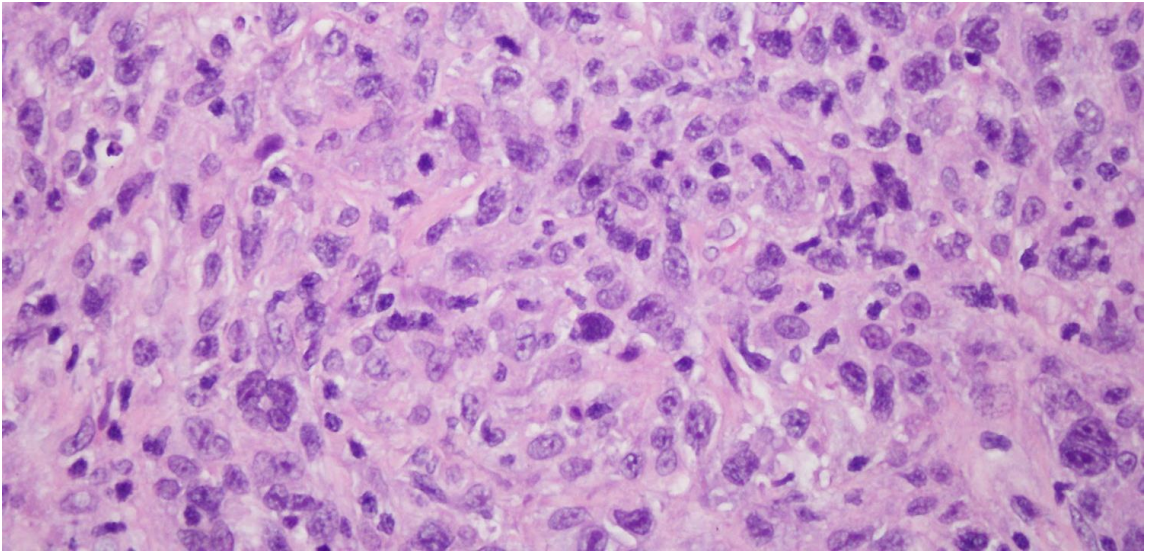
Resim 2: Lenf nodunda DBBHL ve santroblastik morfoloji (H&E; 20x)

2.7.3 İmmunoblastik Varyant

İmmunoblastik varyantta tümör hücrelerinin %90'ından fazlası tek ve santral yerleşimli nükleol yanı sıra geniş bazofilik sitoplazmaya sahip immunoblast morfolojisinde hücrelerden oluşmaktadır. İmmunoblastlarda plazmasitoid diferansiasyon da izlenebilmekte ve bu olgularda klinik veya immunfenotipik özellikler yardımı ile plazmablastik lenfomanın ekstramedüller tutulumu veya immatür plazma hücreli myelom tanılarına yönelik ayırıcı tanı yapılması gerekmektedir (1). İmmunoblastik varyant ile daha sık görülen santroblastik varyant ayrımı gözlemciler arası uyumsuzluk göstermektedir. Literatürde immunoblastik varyant DBBHL olgularının daha kötü prognoz ile ilişkili olduğunu bildiren yayınlar mevcuttur (48,49).

2.7.4 Anaplastik Varyant

Anaplastik varyant, bizar pleomorfik nükleuslu, büyük veya daha iri hücrelerle karakterli morfolojik varyanttır. Pleomorfik nükleusa sahip büyük hücrelerin bir kısmını Hodgkin/ Reed Sternberg hücrelerine veya anaplastik büyük hücreli lenfomanın neoplastik hücrelerine benzeyebilir. Tümör hücrelerinde görülebilen sinüzoidal veya koheziv büyüme paternleri sebebi ile andiferansiye karsinomu taklit edebilir (50). DBBHL'nin anaplastik varyantı ile sıklıkla sitotoksik T hücreden kaynaklanan anaplastik büyük hücreli lenfoma klinik ve biyolojik olarak tamamen farklı antitelere sahiptir (1).



Resim 3: İnterabdominal kitle, DBBHL ve anaplastik varyant (H&E; 40x)

2.7.5 Nadir Morfolojik Varyantlar

Nadir olarak DBBHL, NOS tanısı alan olgularda miksoid stroma veya fibriler matris görülebilmektedir. Psödorozet formasyonu da nadir görülen diğer bir bulgudur. İğsi ya da taşlı yüzük görünümündeki neoplastik hücreler de daha az sıklıkta görülen morfolojik varyantlardır. Ultrastrüktürel değerlendirmelerde sitoplazmik granüllerin varlığı, mikrovillöz projeksiyonlar gibi bulgular da saptanmıştır (1).

2.8 İmmunhistokimyasal Özellikler

Diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL) olgularında tümör hücreleri CD19, CD20, CD22, CD79a ve PAX5 immunhistokimyasal belirteçlerden oluşan pan-B belirteçlerini eksprese ederler. Ancak bazı olgularda bu belirteçlerden bir ya da birkaçı negatif olabilir. Yüzey ve sitoplazmik immunglobulinler (sıklık sırası ile IgM, IgG, IgA) olguların %50-75'inde pozitif saptanmaktadır. Sitoplazmik immunglobulin ekspresyonu ile plazma hücresi ilişkili CD138 ekspresyonu arasında ilişki bulunmamaktadır. CD138 belirteci, CD20 pozitif hücrelerde nadiren koekspresyon göstermektedir (1). Özellikle anaplastik varyant morfolojisindeki DBBHL olgularında %10-20 dolayında CD30 pozitifliği bildirilmektedir. (7,8). EBV'nin tümör hücrelerinin büyük kısmında pozitif saptanması durumunda EBV pozitif DBBHL, NOS tanısı göz önünde bulundurulmalıdır. Bu olguların çoğu CD30 pozitif olarak belirlenmiştir (1).

Olguların %5-10'unda neoplastik hücrelerde CD5 eksprese edildiği saptanmıştır (51). CD5 pozitif DBBHL olgularının genellikle *de novo* DBBHL olguları olduğu ve bu olguların nadiren kronik lenfositik lösemi/ küçük lenfositik lenfomadan (KLL/SLL) transforme olduğu belirlenmiştir (1). CD5 pozitif DBBHL olguları cyclin D1 ve/veya SOX11 ekspresyonunun bulunmaması ile "Mantle hücreli lenfomanın" (MHL) blastoid veya pleomorfik varyantlarından ayrılabilir (52). Nadir DBBHL olgularında CCND1 translokasyonu ve SOX11 ekspresyonu olmaksızın cyclin D1 ekspresyonu görülebilir. Ancak bu olgularda görülen cyclin D1 ekspresyonu MHL olgularındaki kadar güçlü ve uniform değildir (53–55).

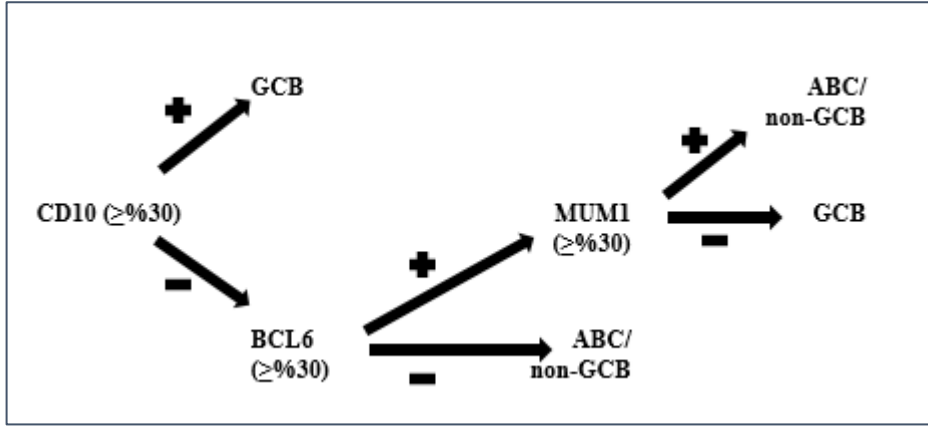
MYC ve BCL2 ekspresyonu oldukça değişken olup bu durum pozitifliğin tanımlandığı eşik değere bağlıdır (9,10,56–61). Literatürde bulunan çalışmaların çoğunda BCL2 pozitifliği için tümör hücrelerinin %50'sinde veya daha fazlasında ekspresyon bulunması, MYC pozitifliği için ise tümör hücrelerinin %40'ında veya daha fazlasında nükleer ekspresyon bulunması şeklinde eşik değer belirtilmiştir. MYC ve BCL2

koekspresyonu durumunda bu olgular “double ekspresör” olarak değerlendirilir. Bu durum ABC moleküler alt grubunda yer alan olgularda daha sıktır (9,10).

2.8.1 Hans Algoritması

CD10, BCL6, IRF4/MUM1, FOXP1, GCET1 ve LMO2 immunhistokimyasal belirteçlerinin pozitifliği konusunda bildirilen insidans oldukça değişkendir (1). Hans algoritmasında DBBHL olgularında CD10, BCL6 ve/veya IRF4/MUM1 ekspresyonu değerlendirilerek olgular germinal merkez B hücre (GCB) ve aktive B hücre (ABC/non-GCB) şeklinde belirtilen hücre kökenine yönelik moleküler alt tiplerde sınıflandırılmaktadır (Şekil 2). CD10, BCL6 ve IRF4/MUM1 immunhistokimyasal belirteçlerinin her üçü de tümör hücrelerinin %30’unda veya daha fazlasında ekspresyon saptanması durumunda pozitif olarak değerlendirilmektedir (6). DBBHL’lerin %30-50’sinde CD10; %60-90’ında BCL6; %35-65’inde IRF4/MUM1 pozitifliği saptanmıştır (62–65). IRF4/MUM1 ve BCL6 koekspresyonu DBBHL’lerin %50’sinde bulunmaktadır (66). FOXP1 ekspresyonu DBBHL’lerin %20’sinde tanımlanmış olmakla birlikte bu olgular germinal merkez fenotipi bulunmayan, t(14;18) (q32;q21.3) yokluğunda IRF4/MUM1 ve BCL2 ekspresyon eden olgulardan oluşmaktadır (66). Bir germinal merkez belirteci olan GCET1 ise DBBHL’lerin %40-50’sinde saptanmış olup GCB tipi ile korele olarak bulunmuştur (67). LMO2 belirteci DBBHL’lerin %45’inde pozitif izlenmiş olup germinal merkez belirteçleri olan CD10, BCL6 ve HGAL ekspresyonu ile koreledir. Ancak LMO2 ekspresyonu ile IRF4/MUM1 ve BCL2 ekspresyonu arasında korelasyon izlenmemektedir (68). BCL2 ekspresyon oranı literatürde oldukça farklılık göstermekte olup %47-84 oranında pozitiflik bildirilmiştir (64,69–71). BCL2 ekspresyon oranlarında bildirilen bu farkın sebebi kullanılan BCL2 antikoru ile ilişkili olabileceği öne sürülmektedir (1). BCL2 ekspresyonunun varlığı ABC tipinde daha sık olmakla birlikte kopya sayısı kazanımı ve translokasyon ile ilişkilidir. GCB tipinde belirlenen BCL2 pozitifliği ise t(14;18) (q32;q21.3) varlığı ile ilişkilendirilmiştir (10,72).

Diffüz büyük B hücreli lenfoma olgularında KI67 proliferasyon indeksi çoğunlukla yüksektir. KI67 proliferasyon indeksi olguların genelinde %40’ın üzerinde, bazılarında %90’ın üzerinde saptanmıştır (12–14,73). Olguların %20-60’ında p53 ekspresyonu saptanmış olup bazı olgularda “TP53 wild type upregülasyonu” yönünde mutasyon varlığı ile ilişkilendirilmiştir (74–78).

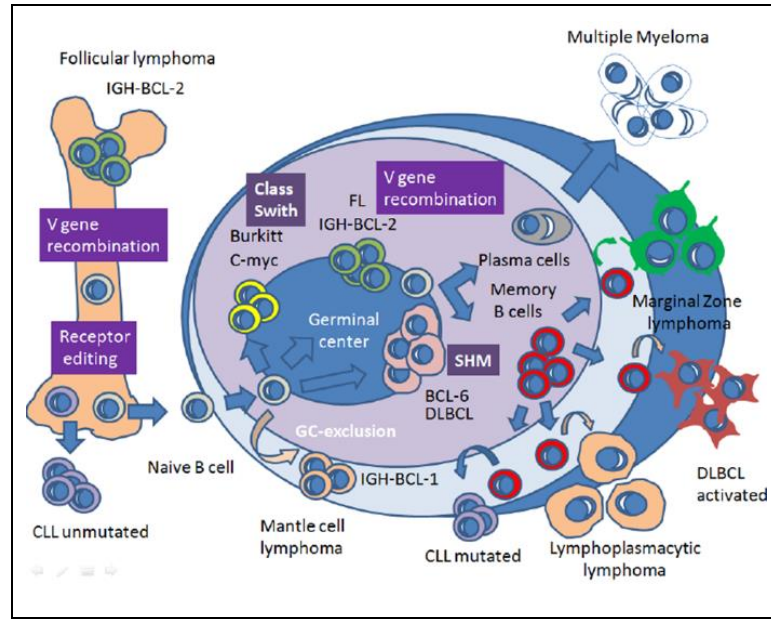


Sekil 2: Hans Algoritması (6)

GCB: Germinal merkez B hücre **ABC/non-GCB:** Aktive B hücre

2.9 Tümörün Köken Aldığı Hücre Tipi

Diffüz büyük B hücreli lenfomalar (DBBHL) periferel matür B hücrelerden köken alır. Bu hücreler germinal merkez kökenli hücrelerden (GCB alt tipi) ya da post germinal merkez kökenli (ABC) germinal merkezden çıkmış/ erken plazmablastik hücrelerden oluşmaktadır. Hücre kökenindeki farklılıklar, gen ekspresyonu, kromozomal aberasyonlar veya rekürren mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkan farklı biyolojileri belirlemektedir. Ayrıca CHOP (siklofosfamid, adriamisin, vinkristin, metil prednizolon) ve rituximab kemoterapi rejimi uygulanan hastalarda tekrarlanabilir sağkalım farklılıklarının da hücre kökenindeki farklılıklar ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu sebeple ABC ve GCB alt tiplerinin doğru olarak belirlenmesi DBBHL, NOS olgularında önemli yere sahiptir (1).



Sekil 3: Diffüz büyük B hücreli lenfomaların köken aldığı hücre tipi (79)

2.9.1 Tümörün Köken Aldığı Hücre Tipine Göre Alt Tiplere

Gen ekspresyon profili temel alınarak DBBHL'ler GCB ve ABC (non-GCB) alt tipi olarak iki ana moleküler alt grupta incelenmektedir. Olguların yaklaşık %10-15'i her iki alt tipe de uygun olmamakta ve moleküler olarak sınıflanamayan grupta yer almaktadır (80–84). GCB ve ABC alt tiplerinin sıklıkları coğrafik dağılım, hasta popülasyonunun ortanca yaşı ve kullanılan metodolojiye göre farklılık göstermekle birlikte, genelde GCB alt tipi olguların %60'mını, ABC alt tipi ise %40'mını oluşturmaktadır (10). GCB alt tipinin sıklığının Asya ülkelerinde daha az olduğu belirtilmektedir (45,85–89). Düşük dansiteli gen ekspresyon analizi platformları ile aynı tanımlar tekrarlanabilir ve bu yöntem formalin ile fikse olmuş, parafine gömülü materyallerde uygulanabilir durumdadır (10,90,91). Moleküler sınıflama için geliştirilmiş çok sayıda immunhistokimyasal algoritma mevcuttur ancak bu algoritmaların çoğunda ikili sınıflamalar belirlenmiştir (6,11,65,92–96). Örneğin Hans algoritmasında DBBHL'ler GCB alt tipi ve ABC alt tipi şeklinde iki grupta sınıflanır, ancak bu algoritma sınıflanamayan olguları kapsamamaktadır (1). Tüm immunhistokimyasal algoritmalar rutinde uygulanabilir olmakla birlikte, tekrarlanabilirlik ve kesinlik konusunda eksiklikler bulunmaktadır. Ancak hücre kökeninin belirlenmesi, klinik uygulamada yerini almış olması nedeni ile gereklidir (93,97). Faz I/II çalışmalardan elde edilen ön bilgiler doğrultusunda R-CHOP (rituksimab, siklofosamid, adriamisin, vinkristin, metil prednizolon) tedavisine bortezomib, lenalidomid ve ibrutinib eklenmesinin ABC alt tip olarak sınıflanan DBBHL

hastalarında fayda sağladığı saptanmıştır. Bu sebeple devam eden klinik çalışmalarda hücre kökenine ait durumun belirlenmesi gerektiğine dair sonuçlar elde edilmektedir (98–104). Tanı döneminde tüm DBBHL, NOS olgularının ABC ve GCB alt tiplerinin belirlenmesi gerekmektedir. Gen ekspresyon teknolojileri tüm merkezlerde uygulanabilir olmaması nedeniyle immunhistokimyasal teknolojiler kabul edilebilir bir alternatif olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca moleküler sınıflama için kullanılan algoritma da belirtilmelidir (1).

2.10 Tümörün Genetik Profili

2.10.1 Antijen Reseptör Genleri

Diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL) olgularında klonal olarak yeniden düzenlenen Ig ağır ve hafif zincir genleri saptanabilmektedir. GCB alt tipinde IG genlerinde devam eden somatik hipermutasyon belirlenmiş olmakla birlikte, ABC alt tipinde daha önce gelişmiş somatik hipermutasyon varlığına dair veriler bildirilmiştir (1).

2.10.2 Mutasyon Yükü

Literatürde pek çok çalışmada DBBHL'lerin mutasyon yükü araştırılmış ve bu hastalığın patogeneğinde çok sayıda önemli mutasyon belirlenmiştir (105–108). Pek çok gende spesifik mutasyonların sıklığı hücre kökenine göre belirlenen alt tipe bağlı olarak değişmektedir. Örneğin EZH2 ve GNA13 mutasyonları hemen tamamen GCB alt tipinde görülürken, CARD11, MYD88 ve CD79B mutasyonları karakteristik olarak ABC alt tipinde saptanmaktadır (106,109–111). Rekürren kopya sayısı değişiklikleri de çalışmalarda değerlendirilmiştir. Kromozomal materyalde kazanımlar ve delesyonlar sık izlenmekle birlikte hücre kökenine göre farklılıklar göstermektedir (112,113). Örneğin DBBHL GCB alt tipinde değerlendirilen olgularda sıklıkla 2p16 ve 8q24 kazanımları veya amplifikasyonları, 1p36 ve 10q23 delesyonları bulunmakta iken, ABC alt tipinde değerlendirilen olgularda 3q27,11q23-4 ve 18q21 kazanımları, 6q21 ve 9p21 delesyonları saptanmıştır (112,114–116). MYC loküsünde kopya sayısı kazanımları ve amplifikasyonlarının sıklığı değişken olmakla birlikte GCB alt tipinde ABC alt tipine oranla hafifçe daha sık görülmektedir (10,117,118).

Spesifik ekstrasnodal bölgelerde gelişen DBBHL'lerde yapılan güncel gen çalışmalarında bazı olgularda örtüşen ya da kendine özgü olarak değerlendirilen moleküler

özellikler saptanmaktadır (1). Kadınlarda görülen ve primer meme DBBHL'si olarak değerlendirilen olgular oldukça nadir olmakla birlikte, çalışmalarda bu olgularda ABC alt tipinin daha sık olduğu ve rekürren MYD88 L265P ve CD79B mutasyonlarının saptandığı bildirilmiştir (119). Rekürren MYD88 L265P ve CD79B mutasyonları nadir olarak görülmekle birlikte DBBHL olgularının ABC moleküler alt grubunda daha sık bildirilmiştir. BCL6'yı içeren translokasyonlar MYC yeniden düzenlenimine benzer şekilde olguların bir kısmında görülebilmektedir ancak BCL2 translokasyonları da nadir olarak bildirilmiştir (120). İleri yaş erkeklerde görülen testiküler tümörler içerisinde primer DBBHL'ler sık olarak görülür ve primer SSS lenfomalarına benzer şekilde immün ayrıcalıklı bölgelerin lenfomalarıdır (1). Testiküler DBBHL, NOS olgularında SSS'ne ve kontrateral testise yayılım görülebilir (121). Bu olguların çoğu ABC alt tipindedir. Moleküler çalışmalar ile MYD88 mutasyonu yüksek bir sıklıkta saptanmış, bu olguların bir kısmına CD79B mutasyonunun eşlik ettiği belirlenmiştir (1). MYC ve BCL6 translokasyonlarının olguların bazılarında saptandığı ancak BCL2 translokasyonlarının daha nadir olduğu görülmüştür. Son elde edilen veriler 9p21 lokusundaki kopya sayısı kazanımlarını, PD1 ligandlarının bölgelerini ortaya çıkarmıştır (122). Bunlara ek olarak primer testiküler DBBHL'lerde B hücrelerde PDL1, PDL2 veya her iki proteinin de aşırı ekspresyonuna yol açan nadir translokasyonlar saptanmıştır (122,123). Primer testiküler DBBHL'lerde kromozom 6p21.3 üzerindeki HLA lokuslarında delesyon sonucunda gelişen başka bir ortak genetik alterasyon ile majör doku uygunluk kompleksi (MHC) sınıf I ve II moleküllerinin ekspresyon kaybı saptanmış olup bu bulgu immün sistemden kaçış fenotipi için kanıt durumundadır (124,125).

2.10.3 Kromozomal Translokasyonlar

Diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL) olgularında en sık görülen translokasyon olan ve BCL6 genini de kapsayan 3q27 bölgesinin yeniden düzenlenimi, olguların %30'unda saptanmıştır (126–129). Bu translokasyonlar ABC alt tipinde daha sık görülmüştür (10,130,131). FL için karakteristik olarak kabul edilen t(14;18)(q32;q21) gibi BCL2 genini içeren translokasyonlar DBBHL'lerin %20-30'unda saptanmıştır. GCB alt tipinde bu oran %40 dolayında olup BCL2 ve CD10 ekspresyonu ile yakın ilişki içindedir (10,132,133). Olguların %8-14'ünde MYC yeniden düzenlenimi saptanmış, ABC ve GCB alt tiplerinde eşit oranda bulunmuştur. DBBHL'lerde görülen MYC yeniden düzenlenimi Burkitt lenfomanın aksine kompleks karyotip ile ilişkilidir (56,134–136). DBBHL olgularının yaklaşık yarısında MYC translokasyonu yanı sıra BCL2 ve/veya BCL6 translokasyonu saptanmış ve bu olgular

yeni sınıflamaya eklenmiş bir kategori olan “MYC ve BCL2 ve/veya BCL6 yeniden düzenlenimi ile birlikte olan yüksek dereceli B hücreli lenfoma” ya da diğer adıyla “double / triple hit” lenfoma grubunda değerlendirilmektedir (10)(136). Tipik DBBHL morfolojisine ve izole MYC translokasyonuna sahip olgular DBBHL, NOS kategorisinde yer almaktadır (136,137). MYC translokasyonlarının önemli bir kısmı IG lokusunu içermekte olan transloke olan diğer partnerleri IGH, IGK ve IGL olarak saptanmıştır. Diğer IG dışı lokusları içeren transloke olan partnerler PAX5, BCL6, BCL11A, IKZF1 (KAROS) ve BTG’dir (81,137). IG dışı transloke olan partnerleri belirlenmesi kullanılan FISH yöntemine bağlıdır (136,138). MYC translokasyonu bulunan DBBHL, NOS olgularının çoğu “double” ekspresördür (örneğin immunhistokimyasal yöntemle hem MYC hem BCL2 pozitif olgular) (9,10,56). MYC translokasyonu bulunan olgularda KI67 proliferasyon indeksi çok değişken olmakla birlikte daha yüksek olma eğilimindedir ancak FISH testi için tarama olarak kullanıma uygun değildir. DBBHL, NOS olgularında ayrıca GCB alt tipinde görülen *TBL1XR1* translokasyonu yanı sıra primer testiküler DBBHL’lerde daha sık görülen *CD274* (*PDCD1LG1* ve ya *PDL1*) ve *PDCD1LG2* (*PDL2*) yeniden düzenlenimi saptanmıştır (123,139).

2.11 Genetik Yatkınlık

Son yıllarda yapılan vaka kontrol çalışmalarında bireylerde DBBHL gelişimi için predispozan olabilecek genetik lokuslar saptanmıştır (140,141). Avrupa çalışmalarında elde edilen bulgular doğu Asya popülasyonunda yapılan çalışmalardaki bulgularla benzer şekilde bulunmuş olup bu durum ortak bir risk faktörü olduğu yönünde düşündürmüştür (142). Bu lokuslardaki genlerin belirlenmesi DBBHL’lerde immün farkındalık ve immün fonksiyonun patogeneizde etkili olduğunu göstermiştir (140).

2.12 Prognostik ve Prediktif Etkenler

2.12.1 Klinik Özellikler

Hastalık evresi ve hasta yaşı sağkalımı etkileyen önemli faktörlerdir (1). R-CHOP döneminde beş yıllık progresyonsuz sağkalım oranı %60 ve toplam sağkalım oranı %65 dolayındadır (143). Beş klinik değişkenden oluşan “uluslararası prognostik indeks” (IPI) bir prognostik araç olarak değerini korumaktadır (1). Bununla birlikte en yüksek riskli klinik özelliklere sahip hastaları belirlemek için yeni varyasyonlar tanımlanmıştır (144,145). Kötü prognoz ile ilişkili diğer klinik prognostik faktörler; tümör kitlesinin boyutu (10 cm ve

üzerinde olan kitle), erkek cinsiyet, D vitamini eksikliği, düşük vücut kitle indeksi, yüksek serum hafif zincir düzeyi, yüksek monoklonal serum IgM proteini, düşük absolü lenfosit/monosit sayımı ve konkordan kemik iliği tutulumu şeklindedir (146–149). Konkordan kemik iliği tutulumu ayrıca SSS’de relaps artışını öngörmeye etkili bir faktör olup bazı merkezlerde bu durumda SSS profilaksisi uygulanmaktadır (1).

Tablo 2: Uluslararası Prognostik İndeks (IPI) (150)

Prognostik faktörler	
Yaş	>60
Ann-Arbor Evresi	İleri evre (Evre III-IV)
Performans durumu	ECOG 2-4
Ekstranodal tutulum	≥ 2 alan
Serum LDH düzeyi	> normal

Her faktör 1 puandır

Tablo 3: IPI Risk kategorileri (150)

Risk faktörleri (n)	Risk kategorisi
0 - 1	Düşük
2	Düşük-orta
3	Yüksek-orta
4-5	Yüksek

2.12.2 Morfolojik Özellikler

İmmunoblastik özelliklerin prognostik etkisi ile ilgili çok sayıda birbiri ile çelişen sonuçlara sahip çalışmalar yayınlanmıştır (49). Literatürde bulunan çalışmaların bazılarında immunoblastik özelliklerin kötü prognostik etkisi olduğu bildirilmiş olmakla birlikte diğer çalışmaların sonucunda bu yönde bulgu mevcut değildir. Bu çalışmalardaki tekrarlanabilirlik ve değişken kriterler önemli engelleri oluşturmaktadır (1). İmmunoblastik varyant özellikle IG lokuslarını içeren MYC translokasyonları ile ilişkilidir. Bu olgularda sıklıkla CD10 ekspresyonu saptanmıştır (151).

2.12.3 İmmunhistokimyasal Özellikler

Prognostik etkiye sahip çok sayıda immunhistokimyasal belirteç bildirilmiş olmakla birlikte validasyonu tamamlanmış bulgu mevcut olmadığından prognostik olarak kullanılabilir ve kabul görmüş rutin biyobelirteç bulunmamaktadır (152,153).

De novo CD5 pozitif DBBHL'lerin prognostik önemi ile ilgili değişken sonuçlar bildiren çalışmalar mevcuttur (154,155). Sıklıkla yüksek riskli klinik özellikler ile ilişkili olduğu bildirilmiş olup bu durum genelde Asya popülasyonlarında ve ABC alt tipinde saptanmıştır (156).

BCL2 ve BCL6 ise CHOP kemoterapi rejimine rituximab eklenmesi ile prognostik etkisinde değişiklik olduğu bildirilmiş biyobelirteçlere örnektir (157,158). İmmunhistokimyasal biyobelirteçlerin çoğu biyolojiyi yansıtmakta olup prediktif değildir. Mevcut çalışmalarda elde edilen sonuçlar genelde çelişkilidir. Günümüzde DBBHL'lerde başlangıç tedavisinde ya da tedavinin devamında alınan kararlarda biyobelirteçlerin etkisi olduğundan güncel çalışmalarda prediktif değere sahip biyobelirteçlerin geliştirilmesi konusunda araştırmalar yapılmaktadır (1). Faz III klinik çalışmalarda test edilen hücre kökenini belirlemeye yönelik belirteçler (ABC ve GCB alt tipi gibi) yanı sıra özellikle MYC genini içeren DBBHL ile ilişkili onkogen translokasyonlarının varlığını gösteren belirteçler günümüzde kullanılan prediktif belirteçleri oluşturmaktadır (10). Son dönemde yapılan bir meta analiz çalışmasında gen ekspresyon profili ile belirlenen hücre kökeninin prognostik öneme sahip olduğu açıkça ortaya konmuş olup aynı sonuçlar immunhistokimyasal algoritmalar sonucunda elde edilen hücre kökenine ait veriler için geçerli bulunmamıştır (97). Çalışmalarda DBBHL, NOS olgularının yaklaşık %30'unda saptanan, MYC ve BCL2 proteinleri ile değerlendirilen "double" ekspresör durumunun kötü prognoz ile ilişkilendirildiği sonuçlar mevcut olup bu veri ile ilgili çelişkili yayınlar mevcuttur (159,160). DBBHL, NOS olgularındaki "double" ekspresör durumu özellikle SSS relapsı için artmış risk ile ilişkilendirilmiş olup bu risk faktörü SSS Uluslararası Prognostik İndeks'ten (CNS-IPI) bağımsız olarak değerlendirilmektedir (161). MYC ve BCL2 immunhistokimyasal belirteçlerinin pozitifliği nedeni ile "double" ekspresör olup bu genlerde yeniden düzenlenime sahip olan olgular yanı sıra MYC ve BCL6 yeniden düzenlenimi saptanan olgular "MYC ve BCL2 ve/veya BCL6 yeniden düzenlenimi ile birlikte olan yüksek dereceli B hücreli lenfoma" kategorisinde yer almaktadır. Bazı çalışmalarda EBV negatif DBBHL'lerde CD30 ekspresyonunun olguların %10-20'sinde saptandığı ve daha iyi prognoz ile ilişkili olduğu

bildirilmiştir (7,162). Anti-CD30 tedavi ile CD30 ekspresyonu gösteren olgularda tedaviye bağlı olarak daha iyi sonuçlar elde edilebilir (1).

2.12.4 Proliferasyon İndeksi

Ki67 proliferasyon indeksi ile değerlendirilen proliferatif aktivitenin prognostik önemi konusunda çelişkili sonuçlar mevcuttur (1). Hem CHOP hem de R-CHOP dönemlerinden yapılan çalışmalara ait sonuçlarda ortak bulgular elde edilememiş olmakla birlikte bu çalışmalarda hasta yaşı, diğer klinik değişkenler ve hücre kökeni durumu hakkında değerlendirmeler yeterli değildir (9,163).

2.12.5 Genetik özellikler

Literatürde bazı çalışmalarda R-CHOP ile tedavi edilen GCB alt tipinde yer alan DBBHL olgularında BCL2 translokasyonunun varlığının daha kötü prognostik sonuçlar ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (132,133,164). BCL2 kopya sayısı kazanımlarının varlığı ise ABC alt tipinde daha düşük oranda sağkalım açısından prediktif olduğu saptanmıştır (117). BCL6 translokasyonu DBBHL ABC alt tipinde daha sık görülen bir bulgu olup bazı çalışmalarda daha uzun sağkalım süresi ile ilişkilendirilmiştir (127,130,165). DBBHL, NOS olgularının %8-14'ünde görülen MYC translokasyonlarının ise daha kısa süreli sağkalım ile ilişkili olduğu belirtilen çalışmalar mevcuttur (135,136,163,166). BCL2 ve BCL6 de dahil diğer ek onkogenlerin tespiti için FISH yönteminin uygulanması konusu ise yayımlanmış veriler ile ilgili karışıklığa sebep olmaktadır (1). Çoğu çalışmada MYC ve BCL2 belirteçleri ile pozitif “double hit” lenfomaların GCB alt tipinde daha sık görüldüğü ve daha kısa sağkalım ile ilişkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır (10,135,137,167). ABC alt tipinde daha sık görülen bir durum olan MYC ve BCL6 translokasyonlarının prognostik etkisi ile ilgili sonuçlar daha çok çelişmektedir (10,168,169). Bahsedilen “double hit” lenfomalar; DBBHL, NOS kategorisinden çıkarılmış ve “MYC ve BCL2 ve/veya BCL6 yeniden düzenlenimi gösteren yüksek dereceli B hücreli lenfomalar” tanı grubuna dahil edilmiştir (1). Bazı çalışmalarda yalnızca MYC translokasyonu bulunan DBBHL’lerin de azalmış sağkalım süresi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (136,163,170). MYC kopya sayısı kazanımları ve amplifikasyonları da daha kötü sonuçlar ile ilişkilendirilmiş olup kazanım ve amplifikasyon tanımlarında çalışmalar arasındaki farklılıklar sebebi ile elde edilen bulgular tutarlı değildir (117,118). TP53 kaybı ve/veya mutasyonları da benzer şekilde azalmış sağkalım süresi ile

ilişkili bulunmuştur (77,78). Kromozom 9p21 üzerindeki CDKN2A lokusundaki delesyonlar ve trizomi 3, özellikle ABC alt tipinde daha kısa sağkalım süresi ile ilişkili olarak belirlenmiştir (116). DBBHL'lerde FOXO1 dışındaki diğer rekürren mutasyonların prognostik rolü konusunda kesin veriler bulunmamaktadır (171). Gelecekte hedefe yönelik tedavilerin gelişiminde DBBHL'lerde saptanan mutasyonların en azından bir kısmının önemli olacağına dair beklentiler mevcuttur (172).

2.12.6 Mikroçevre

Gen ekspresyon profili ile ilgili çalışmalarda DBBHL'lerde tümör mikroçevresinde yer alan neoplastik olmayan hücrelerin ve ekstrasellüler matriks komponentlerinin prognostik rolü olduğu gösterilmiştir (17). R-CHOP tedavi döneminde stromal-1 (ekstrasellüler matriks depolanması ve histiyositik infiltrasyon) ve stromal-2 (tümör kan damarı dansitesi/ anjiogenez) imzalarının prognostik olduğu gösterilmiştir (82). Genlerden birinin (TNFRSF9) tümör mikroçevresini temsil ettiği iki gen ekspresyon imzasının da prognozu öngörmede etkili olduğu saptanmıştır (173). DBBHL'lerde mutasyon yükünü araştıran çalışmalarda beta-2 mikroglobulin, CD58 mutasyonları ve aberan protein ekspresyonlarını da içeren, neoplastik B hücreler ve non-neoplastik hücreler arasındaki iletişimi hedef alan genlerde çok sayıda rekürren mutasyonlar tespit edilmiştir (106,174). MHC sınıf II moleküllerinin kaybının, tümörü infiltre eden CD8 pozitif T lenfositlerin azalmış olması yanı sıra kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (18,175). İmmün kaçış mekanizmaları da DBBHL'lerde önemli onkojenik belirleyicilerdir (1). DBBHL, NOS olgularındaki PD-L1 aşırı ekspresyonun, azalmış sağkalım süresi ile ilişkili olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur. Diğer immün sistem hücrelerinin prognostik önemi ve periferik kandaki durumlarının değerlendirilmesi için yeterli çalışma bulunmamaktadır (1).

2.12.7 MikroRNA

Çok sayıda çalışmada DBBHL'lerde mikroRNA ekspresyon paternleri ile prognoz arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (176). Bu çalışmalarda mikroRNA'yı da içeren somatik mutasyonların DBBHL'lerde hücre kökeni ve IPI skorundan bağımsız olarak prognostik önemi olduğuna dair veriler mevcuttur (177).

2.12.8 Konak (Host) Genetiği

Son dönemde konak genetiğine yönelik yapılan araştırmalar sonucunda DBBHL, NOS olgularında prognostik rolü olduğu saptanmıştır. Kromozom 5q23.2 ve 6q21’de tek nükleotid polimorfizmleri içeren lokuslar ile R-CHOP tedavisindeki DBBHL hastalarında olaysız sağkalım arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (178).

2.12.9 Tedavi

İleri evre DBBHL, NOS hastalarında standart tedavi R-CHOP olarak kabul edilmektedir. Başka tedavi rejimleri de bulunmakla birlikte bu tedavilerin genel sağkalım üzerine faydaları konusunda kesin bilgi bulunmamaktadır (143). DBBHL ABC alt tipinde sağkalımı iyileştirmek amacı ile yapılan girişimler R-CHOP tedavisine yeni ajanların eklenmesi şeklinde gerçekleştirilmektedir (98–100).

2.13 Tanısal ve Prognostik Öneme Sahip Yardımcı Yöntemler

2.13.1 İmmunhistokimyasal Yöntemler

İmmunhistokimya doku kesitlerinde spesifik antijenlerden oluşan hedeflere yönelik monoklonal ya da poliklonal antikorların kullanımı, antikor-antijen reaksiyonunun tek basamaklı direk enzimatik reaksiyon ya da iki basamaklı indirek enzimatik reaksiyon ile işaretlenmesi yöntemi ile proteinlerin lokalize edilmesine dayalı bir işlemdir. Direk enzimatik reaksiyon yönteminde primer antikor enzimatik kompleks ile konjugat oluşturur. Direk enzimatik reaksiyon yöntem ile kıyaslandığında daha sık kullanılan ve sensitif olarak kabul edilen indirek enzimatik reaksiyon metodunda antijen ilk basamakta bir primer antikor ile, ikinci basamakta ise enzimatik bir kompleks ile konjugat oluşturan sekonder antikor ile belirlenir. Diaminobenzidin (DAB), alkalen fosfataz gibi substratların kalorimetrik reaksiyonu ile mikroskop altında doğrulayıcı morfolojik parametreler doğrultusunda antijenin varlığı gösterilmiş olur. Çok basamaklı protokoller peroksidaz- antiperoksidaz (PAP), avidin-biotin kojugatu (ABC) ve biotin- strepavidin (BSA) yöntemlerini içermektedir. Formalin ile fikse olmuş parafine gömülü dokuda çok sayıda hedefin belirlenmesi için mikrodalga fırında üretilen yüksek ısı maruziyetine dayanan “antijen retrieval” işlemi gereklidir. İmmunhistokimyasal boyanma paternleri ise antijenin lokasyonuna ve dağılımına göre

nükleus, sitoplazma, sitoplazmik membran ve/veya nükleolde gözlenen bir renk reaksiyonuna göre değerlendirilir.

İmmunhistokimyasal yöntemler tanısal olarak öneme sahip olmalarının yanısıra hücre kökeninin belirlenmesi, matürasyon düzeyinin değerlendirilmesi ve prognostik faktörlere katkıda bulunulması açısından da yardımcı yöntemlerdir. Monoklonal veya poliklonal antikoların, otomatizasyonun ve formalin ile fikse olmuş parafine gömülü dokulara göre tasarlanmış “antijen retrieval” yönteminin kolay kullanılabilir olması sebebi ile immunhistokimyasal teknikler günlük patoloji pratiğinde yer almaktadır (37).

2.13.2 CD20

CD20 B hücrelerin aktivasyonunda görev alan 35 kilodaltonluk bir transmembran proteindir (179). CD20 antijeni geç dönem pre-B hücreler ve matür hücrelerde mevcut olup prekürsör B hücrelerde veya terminal olarak diferansiye olmuş plazma hücrelerinde bulunmamaktadır. Bu dönem, B hücrelerde immunglobulin hafif zincir geninin yeniden düzenlenimi ile yüzey immunglobulinlerinin ekspresyonu arasındaki dönemden oluşmaktadır. CD20 antijeninin B hücrelerde CD19 ve CD10 antijenlerinden daha sonra hücre yüzeyinde eksprese edildiği bilinmektedir. CD20 antijeninin fonksiyonu kesin olarak bilinmemekle birlikte B hücre aktivasyonunda, B hücre büyümesinin regülasyonunda, transmembran kalsiyum taşınmasının düzenleniminde görev almaktadır (37). CD20 antijeni L26 antikoru tarafından tanınmaktadır (180). B hücreli lenfomalarda sıklıkla ve B lenfoblastik lösemi/ lenfomaların bir kısmında eksprese edilir. Ayrıca nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfoma olgularında neoplastik hücrelerde, klasik Hodgkin lenfomaların bir kısmında ve nadiren plazma hücreli neoplazilerde CD20 ekspresyonu görülmektedir (37). CD20 ayrıca, CD20 pozitif lenfomalarda anti-CD20 moleküler hedef tedavisi olan Rituximab için hedef görevi görmektedir. Rituximab ile tedavi edilen hastalarda CD20 ekspresyon kaybı görülebileceğinden bu durumda diğer B hücre belirteçleri olan ve anti-CD20 tedavisinden etkilenmeyen PAX5, CD19 ve CD79a belirteçleri ile B hücre kökeninin doğrulanması gerekebilir (180).

2.13.3 CD19

CD19 immunglobulin süperailisine ait 95 kilodaltonluk, tip I transmembran glikoproteindir. B hücre diferansiasyonu boyunca çoğu aşamada ekspresyonu devam etmekle birlikte plazma hücrelerine terminal diferansiasyon döneminde “down-regülasyon” görülür. CD19 antijeni, B hücrelerde CD21, CD81 ve CD225 ile birlikte sinyal transdüksiyon kompleksi oluşturur. B hücrelerden köken alan neoplazilerin çoğunda CD19 ekspresyonu bulunmaktadır. Formalin ile fikse olmuş, parafine gömülü dokularda bu antijenin varlığını saptamak için antikolar geliştirilmiştir (180).

2.13.4 CD79

CD79 antijeni, CD79a ve CD79b olarak adlandırılan iki proteinden oluşmaktadır. CD79a, B hücre antijen reseptörünün immunglobulin alfa proteini ile CD79b ise immunglobulin beta proteini ile reaksiyon göstermektedir. CD79 ekspresyonu immunglobulin ağır zincir gen rearanjmanı ve CD20 ekspresyonu öncesinde gerçekleşmekte olup B hücre kökenini göstermekte yararlıdır. B hücreli lenfomalarda, B hücre dizilerinde, B hücre kökenine ait akut lösemilerin çoğunda ve bazı myelomlarda CD79 ekspresyonu saptanmıştır. CD79 antijeni, B hücre kökenini göstermek için kullanışlıdır. Ancak CD79 antijeninin, B hücreli lenfomalar dışında da akut myeloid lösemide, megakaryositlerde ve megakaryositik lezyonlarda pozitifliği bildirilmiştir. Bu pozitiflik antikor klonuna bağlı olup klon 11E3 ve JCB117 B hücreli lenfomalar dışında ekspresyon konusunda en düşük pozitiflik oranlarına sahiptir (180).

2.13.5 PAX5

PAX5 geni transkripsiyon faktörlerinin paired box (PAX) ailesinin bir üyesidir. PAX5 antijeni yalnızca B hücre dizisinde bulunan 52 kilodaltonluk bir molekül olup B hücre diferansiasyonunun erken evrelerinde saptanmaktadır. B hücre dizisinde PAX5 gen transkripsiyonu pro-B hücrelerde başlar. Pre-B hücrelerde ve matür B hücre diferansiasyon evrelerinde yüksek düzeyde PAX5 gen transkripsiyonu mevcut iken, terminal diferansiye plazma hücrelerinde PAX5 gen transkripsiyonu bulunmamaktadır. PAX5 ekspresyonunun hemen tamamen B hücre dizisi ile sınırlı olması, B hücre diferansiasyonu sırasında geniş ekspresyonunun bulunması önemli iki karakteristik özelliğini oluşturur. PAX5 proteinine karşı geliştirilmiş poliklonal ve monoklonal antikolar pan-B hücre belirteci ve pre-B hücre

belirteci olarak rutin histolojik prosedürlerde oldukça kullanışlıdır. Normal lenfoid dokuda PAX5, B lenfositlerin nukleusunda ekspresyon göstermekte olup plazma hücrelerinde ekspresyon bulunmamaktadır. B lenfositlerde PAX5 nükleer aktivitesi mantle zonlarda yoğun, germinal merkezde zayıf-orta şiddettedir (180).

2.13.6 CD3

T hücre antijen reseptörü hücre membranında CD3 protein kompleksine bağlanır. CD3 T hücre kökenine spesifik bir antijendir. Poliklonal anti-CD3 antikoru ile fiksasyonu uygun dokularda T hücreli lenfomaların çoğunda pozitif reaksiyon saptanmaktadır (180). CD3 T hücre kökenine spesifik bir antijen olarak bilinmekle birlikte nadir B hücreli lenfomalarda özellikle de DBBHL tanısı alan olgularda aberan ekspresyonu bildirilmiştir (181).

2.13.7 CD10 (CALLA/common ALL antijen)

CD10 erken lenfoid progenitörlerde ve normal germinal merkez hücrelerinde eksprese edilen, çinko metallopeptidaz aktivitesi bulunan bir proteindir. Prekürsör B lenfoblastik lösemi/lenfomalarda ve Burkitt lenfomalarda hemen her zaman, prekürsör T lenfoblastik lösemi/lenfomalarda daha az sıklıkta eksprese edilir. Folliküler lenfomaların çoğunda, DBBHL'lerin bir kısmında ve myelomda CD10 pozitifliği görülebilir. CD10 ve BCL6, germinal merkez belirteçleri olarak bilinmektedir (180).

2.13.8 BCL6

BCL6, germinal merkez lenfositlerinde eksprese edilen transkripsiyonel regülatuar göreve sahip bir proteindir. Normal lenf nodülünde boyanma paterni ve dağılımı BCL2 pozitif hücre dağılımı ile zıt görünümündedir. B hücreli lenfomalarda değişken oranda pozitiflik gösteren BCL6, nükleer boyanma paternine sahiptir. Folliküler lenfoma progresyonunda BCL6'da ekspresyon kaybı görülebilir. BCL6 germinal merkez gelişiminin kontrolünde ve T hücre bağımlı antijen cevabında görev almaktadır. Lenfoid dokularda sekonder folliküllerin germinal merkezlerinde hem santroblasttan zengin koyu zonda, hem de santrositten zengin açık zonda bulunan B hücrelerinde BCL6 proteini yer almaktadır. Bir hücrede BCL6 pozitifliğinin saptanması, söz konusu hücrenin germinal merkez kökenli olduğunu gösterir. BCL6 ayrıca mantle zonda, parakortikal alanlarda ve germinal merkezlerde yer alan CD4

pozitif T hücrelerin çok az sayıda bir kısmı yanı sıra büyük perifoliküler CD30 pozitif lenfoid hücrelerde saptanabilmektedir. Folliküler lenfomalarda BCL6 belirtecinin kuvvetli nükleer pozitifliği normal lenf nodülünde germinal merkez boyanması ile benzer şekildedir. BCL6 ekspresyonu Burkitt lenfomaların ve DBBHL'lerin çoğunda mevcuttur (180).

2.13.9 MUM1/ IRF4 (The multiple myeloma oncogene 1/ interferon regulatory factor)

MUM1/ IRF4 geni myelom ilişkili bir onkogen olarak tanımlanmış olup t(6;14)(p25;q32) sonucunda transkripsiyonel düzeyde aktive olur. MUM1 ekspresyonu lenfoplazmasitik lenfoma, folliküler lenfoma (FL) (derece III), marjinal zon lenfoma, DBBHL, primer efüzyon lenfoması, klasik Hodgkin lenfoma, multipl myelom, anaplastik büyük hücreli lenfoma, periferal T hücreli lenfomalarda ve genelde neoplastik hücrelerin %20-30'undan fazlasında orta-yoğun boyanma şiddetinde saptanmaktadır. Düşük dereceli FL olgularında ve Mantle hücreli lenfomalarda boyanma şiddeti genelde daha zayıftır ve hücrelerin az bir kısmında pozitiflik izlenir. MUM1 transkripsiyon faktörleri olan interferon regülatuar faktör ailesinin bir üyesidir. MUM1 ekspresyonu neoplastik olmayan plazma hücreleri, geç B lenfositler ve aktive T hücrelerde görülmektedir (180).

2.13.10 BCL2

BCL2, lenfomalarda tanımlanmış ilk translokasyon ilişkili proteindir. Folliküler lenfoma olgularının yaklaşık dörtte üçünde t(14;18) mevcut olup BCL2 geni ile IG ağır zincir geni arasında gerçekleşen translokasyon sonucunda BCL2 aşırı ekspresyonu görülür. Heterodimerik bir kompleksin parçası olan BCL2 proteini anti-apoptotik fonksiyona sahiptir. BCL2, neoplastik olmayan mantle zon B hücrelerinde, germinal merkez hücrelerinin bir kısmında ve çok sayıda T lenfositte eksprese edilir. Folliküler lenfoma dışındaki lenfomalarda da ekspresyonu görülebilmekle birlikte bu durum t(14;18) ile ilişkisizdir. BCL2 antijeninin normal ekspresyon paterni ya da ekspresyon kaybının varlığı benign ve neoplastik lenfoproliferatif lezyonların ayrımı yanı sıra folliküler lenfoma ile reaktif germinal merkezlerin ayrımında oldukça kullanışlıdır. Ancak bu ayrım çok sayıda BCL2 eksprese eden T lenfosit varlığında güç olabilir (180).

2.13.11 MYC

MYC, proliferasyon, apoptoz gibi hücrel süreçler yanı sıra mikroRNA'ların regülasyonunda da görevli bir transkripsiyon faktörüdür. MYC ekspresyonu malignitelerin çoğunda görülmekle birlikte aktivasyon yolağı hastalıklar arasında hatta olgular arasında bile oldukça değişkendir. Lenfomaların patogeneğinde MYC aşırı ekspresyonunun en önemli mekanizması IG gibi bir enhancer ile MYC arasında yeniden düzenlenim olmasıdır. MYC translokasyonları çok sayıda matür B hücreli lenfoma grubu yanı sıra akut lenfoblastik lösemi/ lenfoma olgularında da saptanmıştır. Burkitt lenfoma (BL) olgularında t(8;14)(q24;q32) sonucunda gelişen MYC aktivasyonunun hastalık başlatıcı olay olduğu ve bu sebeple BL için tanısallığı bilinmektedir. MYC translokasyonları diğer lenfomalarda da saptanmış olup genellikle bu translokasyonların hastalığın seyri sırasında sekonder bir olay olduğu görüşü mevcuttur. MYC translokasyonları yanı sıra bir onkogen aktivasyonuna sebep olan diğer rekürren kromozomal yeniden düzenlenimleri bulunan lenfomalar için "double hit" lenfoma terimi kullanılmaktadır. İki ya üç ek translokasyonu bulunan lenfomalar için de sırası ile "triple hit" lenfoma ve "quadruple hit" lenfoma tanımlaması mevcuttur. "Multipl hit" lenfomalar daha agresif klinik davranış ve konvansiyonel kemoterapiye direnç ile ilişkilidir (182).

2.13.12 CD30

CD30 antijeni tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör süper ailesinin bir üyesidir. Çok sayıda hastalıkla solubl CD30 pozitifliği saptanmıştır. CD30 ekspresyonu membranöz ya da perinükleer nokta tarzındadır. Sitoplazmik CD30 boyanması varlığında pozitiflik açısından şüphe ile yaklaşılmalıdır. Normal lenfoid dokularda arada saçılmış halde ve küçük boy lenfoid hücrelerde pozitiflik mevcuttur. Anaplastik büyük hücreli lenfoma, lenfomatoid papüllozis ve klasik Hodgkin lenfoma olgularında CD30 ekspresyonu görülmektedir. CD30 germ hücreli tümörlerin ve melanomların bir kısmında da pozitif saptanmakta olup lenfomaya özgü bir biyobelirteç değildir. CD30 antijeninin T helper hücrelerinin Th2 tipi ile ilişkili bir belirteç ya da düzenleyici görevi olabileceği ileri sürülmüştür (180).

2.13.13 Ki67

Ki67 antikoru hücre siklusunun proliferatif fazında görevli nükleer bir protein ile reaksiyon verir. Ki67 ekspresyonu, pozitif hücreler ile tüm hücrelerin oranının hesaplanmasıyla ifade edilir ve hücre büyüme hızı ile ilişkili bir ölçüt olarak değerlendirilebilir. Hesaplanan proliferasyon indeksi genelde tümörün derecesi ile doğru orantılı olup Burkitt lenfomada olduğu gibi bazı tümörlerin ayırıcı tanısında öneme sahiptir. Ayrıca Ki67 proliferasyon indeksi ile prognostik sonuçlar arasında MALT lenfoma ve DBBHL olgularında da benzer bir ilişki mevcuttur (180).

2.13.14 İn Situ Hibridizasyon Yöntemi

İn situ hibridizasyon (ISH) sitolojik materyallerde ya da doku kesitlerinde nükleik asitlerin in situ vizualize edilebilmesi için elverişli bir yöntemdir. Günümüzde kromojenik in situ hibridizasyon (CISH) ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) prosedürlerinin gelişimi ile hibridizasyon ürününün saptanma oranlarında artış gözlenmiş olması sonucunda pratik ve güvenilir yöntemler olarak kabul edilmektedir. ISH yöntemi virüslerin saptanması gibi pek çok konuda bilimsel platformlarda kullanılmaktadır. ISH protokolleri formalin ile fikse olmuş parafine gömülü doku kesitlerinin deparafinizasyonu, proteolitik sindirme, spesifik prob ile hibridizasyon ve enzim ile substrat yolu ile vizualizasyon basamaklarından oluşmaktadır (182). CISH yönteminde sekonder antikor kullanılarak biotin ya da digoxigenin ile işaretli prob tespit edilir. FISH yönteminde ise karanlık sahada florofor kullanılarak sinyaller belirlenir.

Hematolenfoid sistemde B hücre klonalitesine yönelik kappa ve lambda hafif zincirlerinin değerlendirilmesi ve hücre içerisinde ya da dokulardaki virüsler gibi enfeksiyöz ajanların varlığının tespiti CISH yönteminin ana kullanım alanlarıdır. Epstein-Barr virüs (EBV) ile enfekte hücreler kısa nükleer transkriptler olan latent EBV kodlu RNA (EBER) CISH yöntemi ile belirlenmektedir (182).

2.14 Tümörün Mikroçevresi

Tümörler, neoplastik hücreler yanı sıra inflamatuvar hücreler, fibroblastlar, endotel hücreleri ve bu hücreler arasında salınan molekülleri içermektedir (15). Son dönemde yapılan çalışmalarda tümör mikroçevresinin kanser gelişimi ve progresyonunda önemli etkisi olduğu

gösterilmiştir (16). Kanserin yalnızca genomdaki aberasyonlar ile yönlendirilen bir hastalık olduğuna dair inanış, tümör hücreleri ve yeniden programlanmış stroma arasındaki dinamik etkileşimi içeren ekolojik bir hastalık olduğu yönünde değişmektedir. Tümör mikroçevresindeki intersellüler stromal ve immün hücreler arasındaki iletişim sayesinde, neoplastik hücrelerin konağın anti-tümör immün cevabından kaçışı gerçekleşmektedir (22). Tümör hücreleri, sağkalım ve proliferasyon için tümör mikroçevresindeki non-neoplastik hücreler ve stromal faktörler ile etkileşime belirli bir düzeyde bağımlıdır, ayrıca mikroçevre hastalık progresyonu ile sonuçlanan immün kaçışı başlatan immunsupresif mekanizmaları da geliştirmelerini sağlamaktadır (183).

Tümör mikroçevresini oluşturan hücrelerin yaygınlığını, tümör hücreleri arasındaki dağılımını ve kompozisyonunu belirleyen faktörler, neoplastik hücrelerin içerdiği genetik aberrasyonlar, bu hücrelerin sağkalımı için eksternal uyaranlara bağımlılığının derecesi, proliferasyonu ve immün kaçışı, konağın inflamatuvar cevabını içermektedir. Bu faktörler arasındaki farklılıklar sebebi ile tümör mikroçevresi olgular arasında oldukça geniş bir yelpazeye sahip özellikler göstermektedir (17).

Scott ve Gascoyne tarafından B hücreli lenfomalarda izlenen ve çok çeşitlilik gösteren tümör mikroçevresi için üç temel model tanımlanmıştır. İlk model olarak folliküler lenfomanın tümör mikroçevresi incelenmiştir. Bu modelde neoplastik hücreler sağkalım ve proliferasyon için tümör mikroçevresine bağımlıdır. İkinci modelde, Hodgkin ve Reed-Sternberg hücrelerinin çevresinde normal lenfoid dokudan oldukça farklı ve yoğun olan non-neoplastik hücrelerin bulunduğu Klasik Hodgkin lenfoma olgularındaki tümör mikroçevresi değerlendirilmiştir. Üçüncü modelde, tümör mikroçevresinin ortadan kaldırılması şeklinde tanımlanan, MYC translokasyonu gibi genetik aberasyonlar sayesinde neoplastik hücrelerin otonomi kazandığı, büyüme ve sağkalım açısından mikroçevreden bağımsız olduğu Burkitt lenfoma tipik örnek olarak tanımlanmıştır (17).

Diffüz büyük B hücreli lenfomalarda (DBBHL) da, tümör mikroçevresinde yer alan neoplastik olmayan hücrelerin ve ekstrasellüler matriks bileşenlerinin prognostik öneme sahip olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (17). MHC sınıf II kaybının tümörü infiltre eden CD8 pozitif T hücrelerinin azalması ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (18). İmmün kaçış mekanizmaları da benzer şekilde önemli onkojenik etkiye sahiptir (5).

Son dönemde yapılan çalışmalarda immün sistem hücrelerinin ve ekspres ettikleri reseptörlerin ya da ligandların oluşturduğu tümör mikroçevresinin moleküler ve hücrel yapısının tümör büyümesinde ve klinik progresyonda önemli olduğu ortaya konmuştur (19).

Tümör hücreleri tarafından indüklenen immüsupresyon ile T hücrelerin sitotoksitesinde azalma, regülatuar T hücre gibi immüsupresif T hücrelerde artış, CTLA-4, PD-1 ve PD-L1 gibi inhibitör modülatör moleküllerin ekspresyonunda artış olmaktadır. Bu nedenle tümör mikroçevresinde immünmodülatör faktörlerin ve tümörü infiltre eden T lenfosit benzeri immün sistem hücrelerinin durumunun belirlenmesi solid tümörler yanı sıra lenfomalarda da prognozu öngörmeye etkili olmaktadır. Tümör spesifik sitotoksik CD8 pozitif T lenfositlerin aktivasyonu anti-tümör immün yanıt oluşturur. CD4 pozitif ve bir transkripsiyon faktörü olan FOXP3 ile pozitif regülatuar T hücrelerin (Treg), myeloid-derive supresör hücrelerin ve immün kontrol noktasında etkili olan PD-1 ve PD-L1 gibi moleküllerin CD8 pozitif T hücreler üzerinde inhibitör etkileri bulunmaktadır (20–22).

2.14.1 Tümörü İnfiltre Eden T lenfositler (TİL)

Matür T hücre popülasyonu CD4 ya da CD8 ekspres eden $\alpha\beta$ T hücreler ve CD4 ve CD8 negatif, T hücre reseptörü (TCR) ekspres eden $\gamma\delta$ T hücrelerden oluşmaktadır. CD4 pozitif T helper hücreler sitokin profillerine göre, interferon- γ (IFN- γ) üreten T helper 1 (Th1), IL-4 ve IL-5 üreten T helper 2 (Th2) şeklinde iki farklı tipe ayrılmaktadır. Th1 hücreler sellüler immünitede, Th2 hücreler humoral immünitede görevlidir (184).

2.14.2 CD4, CD8 ve T lenfositler

CD8 pozitif T hücrelerin $\alpha\beta$ T hücre reseptörü, MHC sınıf I tarafından tanıtılan molekülleri, CD4 pozitif T hücrelerin $\alpha\beta$ T hücre reseptörü, MHC sınıf II tarafından tanıtılan molekülleri tanımaktadır. Ancak $\gamma\delta$ T hücrelerin anti tümör immünite ile ilgili fonksiyonu net olarak bilinmemektedir. Anti-tümör immünitede görevli T hücre alt grupları da tümörler arasında farklılık göstermektedir. Tümörlerin çoğu MHC sınıf I pozitif, MHC sınıf II negatiftir. CD8 pozitif sitotoksik T lenfositler, tümörde bulunan MHC sınıf I pozitif molekülleri tanıyarak anti-tümör immünitede yer almaktadır. CD4 pozitif T hücreler de benzer şekilde tümör antijenlerini tanır ve anti-tümör immünitede etkilidir. Tümör immünitesindeki etkin mekanizma tümör hücrelerinin MHC sınıf I antijenini tanıyan CD8 pozitif sitotoksik T hücreler tarafından direk olarak lizise uğramasıdır. Anti-tümör yanıtta

CD4 pozitif T hücrelerin rolü ise, CD8 pozitif T hücrelerin aktivasyonuna yardımcı olmasıdır. CD4 pozitif hücrelerin CD8 pozitif hücrelere yardımcı görevi erken indüksiyon, efektör devamlılık ve hafıza olmak üzere üç fazdan oluşur. Tümör spesifik CD8 pozitif hücre yanıtının indüksiyonu için dendritik hücreler gibi antijen sunan hücreler (APC) tarafından yakalanan antijenlerin sunumu dominant rol oynar. CD4 pozitif T hücreler ise APC'lerin aktivasyonunda etkilidir. Bu aktivasyon CD4 pozitif T hücrelerde bulunan CD40 ligand (CD40L) ve APC'lerde bulunan CD40 arasındaki etkileşim ile sağlanmakta olup bu etkileşimin koruyucu T hücre aracılı tümör immünitesinin gelişiminde önemli olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte dendritik hücrelerin yüksek antijen düzeyi gibi başka bir mekanizma ile aktive edilmesi durumunda CD4 bağımsız sitotoksik T hücre aktivasyonu gerçekleştiğini belirten çalışmalar mevcuttur. Sitotoksik T hücre indüksiyonunda CD4 pozitif T helper hücrelerin rolü tartışmalı bir konu olsa da, hem viral immün yanıt hem de tümör spesifik immün yanıtta sitotoksik T lenfositlerin devamlılığında kritik role sahiptir. CD4 pozitif T hücreler tarafından üretilen IL-2 sitotoksik T lenfositlerin devamlılığında primer mekanizma ya da yan ürün olarak kabul edilmektedir. Antijenin temizlenmesinden sonra efektör sitotoksik T lenfositlerin çoğu apoptoza uğrarken az bir kısmı hafıza fenotipinde lenfositlere dönüşür. Bellek fenotipindeki T hücrelerin efektör cevabı takiben dolaşımda bulunduğu kabul edilmektedir. Ancak CD4 pozitif T hücrelerin bellek T hücrelerinin oluşumundaki rolü tartışmalıdır (184).

2.14.3 Fork-Head Box P3 (FOXP3) ve CD4 Pozitif Regülatuar T Lenfositler (Treg) (Supresör T Hücreler)

Regülatuar T hücreler (Treg) immün sistemin kontrolü, self-antijenlere karşı tolerans gelişimi ve otoimmün hastalıkların önlenmesinde görev alan T hücrelerdir (185). Treg'ler CD4 pozitif periferal T hücrelerin %5-10'unu oluşturmaktadır (186). Sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen 4 (CTLA-4), IL-2, IL-10, TGF- β , IL-35, "glucocorticoid-induced TNF receptor" (GITR), lenfosit aktivasyon geni 3 (LAG3), granzim B, adenosin ve siklik AMP (cAMP) Treg aracılı immunsupresif aktivitede yer aldığı belirlenmiş moleküllerdir (187). Treg'ler IL-10, TGF- β ve IL-35 gibi proteinlerin salınımı ile proinflamatuvar süreci baskılar. Ayrıca Treg'ler CTLA-4 yüzey ekspresyonu ile dendritik hücrelerin "tolerogenic" dendritik hücrelere dönüşümünü sağlayarak APC'lerde bulunan kostimülatörler olan CD80 ve CD86'nın ekspresyonunu azaltması yanı sıra dendritik hücrelerin baskılayıcı bir enzim olan indolamin (2,3)-dioksijenaz üretimini uyarır. İmmün kontrol noktası reseptörü olan lenfosit

aktivasyon geni 3 (LAG3) ve “neuropilin 1” (NRP1) de “tolerogenic” dendritik hücelere dönüşümünde etkilidir. Treg’lerin bir kısmının yüzeyinde oldukça yüksek düzeyde eksprese edilen CD39 ve CD73 ekstrasellüler ATP’yi adenezine dönüştürerek efektör T hücelerin proliferasyonunun inhibisyonu ve dendritik hücelerin fonksiyonunun suprese edilmesini sağlar (186).

Nükleer transkripsiyon faktörü olan FOXP3, Treg’lerin gelişimi ve fonksiyonunda önemli yere sahiptir. FOXP3 hücelerin supresif fenotipi için gerekli gelişimsel basamakların kontrolünde görev alması yanı sıra zaman içinde ekspresyon kaybı sonucunda Treg’lerin supresör aktivitesinde azalmaya sebep olur (187).

IL-10 üreten Tr1 (tip 1 regülatuar T) hüceler, TGF- β -üreten CD4 pozitif Th3 (T helper 3) hüceler, CD4 ve CD25 ve FOXP3 pozitif T hüceler şeklinde 3 tip CD4 pozitif regülatuar T hücre tanımlanmıştır. Tr1 ve Th3 hücelerin her ikisinde de “Fork-Head Box P3” (FOXP3) ekspresyonu bulunmaz. Treg’ler yanı sıra myeloid-derive supresör hüceler (MDSC), regülatuar B hüceler (Breg), regülatuar $\gamma\delta$ T hüceler ($\gamma\delta$ -Treg), immunsupresif plazmositler (ISPC), doğal lenfoid hücelerin (ILC) regülatuar bir alt grubu diğerk immunsupresif hüceler olarak tanımlanmıştır. Tüm bu immün sistemin regülasyonunda görev alan hüceler arasında CD4 ve CD25 ve FOXP3 pozitif regülatuar T hüceler fizyolojik olarak en önemli role sahiptir. Treg’lerin immün yanıtta tanımlanmış mekanizmaları; supresif sitokinler (IL-10, TGF- β , IL-35), metabolik bozulma (cAMP, CD39, CD73), antijen sunucu hücelerin (APC) matürasyon ve fonksiyonunun modülasyonu ve sitoliz yolu ile baskılanması şeklinde özetlenebilir (187). Treg’ler temel olarak FOXP3 ekspresyonu yanı sıra IL-2 reseptörü α zinciri (IL-2R α / CD25) yüksek ekspresyon düzeyi ve IL-7R α -zinciri (CD127) düşük ekspresyon düzeyine sahiptirler (186).

Neoplastik süreçlerde çok çeşitli tümörlerde dolaşımdaki ve tümör dokusundaki Treg hücre sayısı artış göstermektedir. Kemokin reseptör eksprese eden aktive Treg hüceler ve tümör mikroçevresinde üretilen kemokinler arasındaki iletişimin sonucunda Treg hücre göçünün artması intratümöral Treg hücre birikimine sebep olan mekanizmalardan biri olarak öne sürülmektedir. Kemokin- kemokin reseptör iletişimi CCL2 ve CCR4, CCL5ve CCR5, hipoksi aracılı CCL8 ve CCR10, CXCL12 ve CXCR4 arasında gerçekleşmektedir. Tümör mikroçevresinde bulunan reaktif oksijen türlerine karşı Treg’lerin efektör T hücelere kıyasla daha dirençli olması da Treg sayısında rölatif artış ile sonuçlanmaktadır. Treg artışına dair bir başka teori ise Treg’lerin tümör dokusunda tutulmasına ve varlığını sürdürmesine tümör tarafından üretilen yağ asitleri ve laktik asit gibi metabolitlerin yardımcı olması şeklindedir.

Ayrıca tümör mikroçevresinde yüksek düzeydeIDO ve adozin bulunması da Treg artışını destekleyen diğer faktörlerdir (186).

Intratümöral Treg birikimi, ileri evre hastalık ve azalmış sağkalım ile ilişkilendirilmiştir. Tümöral dokuda CD8 pozitif T hücre/ Treg hücre oranının azalmasının, kötü klinik sonuçlar açısından prediktif olduğu saptanmıştır. Kolektif deneysel ve klinik veriler ışığında intratümöral Treg'lerin anti-tümör yanıtı baskılayarak tümör büyümesine ve progresyonuna yardımcı olduğu, tümör anjiogenezini desteklediği, reseptör aktivatör nükleer kappab ligand (RANKL) yolağı ile metastazı stimüle ettiği belirlenmiştir. Bu nedenle kanser tedavisinde Treg sayısını azaltmayı, tümör dokusuna girişini kısıtlamayı ya da Treg fonksiyonunu inhibe etmeyi hedefleyen yaklaşımlar değerlendirilmektedir (186). Ancak Treg'lerin de bulunduğu immunsupresif mikroçevrenin kötü klinik sonuçlar ve tümörün agresif davranışı ile ilişkili olması solid tümörler için geçerli bir durum olup lenfomalarda tümör mikroçevresinin prognostik etkisi ile ilgili sonuçlar çelişkilidir. Lenfomalarda tümörü infiltre eden Treg sayısındaki artış genelde daha iyi klinik sonuçlar ile ilişkili bulunmuştur (188).

2.14.4 CD68, CD163 ve Tümör İlişkili Makrofajlar (TİM)

Tümör mikroçevresinde yer alan stromal hücre grupları arasında makrofajlar, tümör neovaskülarizasyonunda ve progresyonundaki fonksiyonları hakkında elde edilen veriler nedeniyle önem kazanmıştır. Makrofajlar myeloid seriye ait olan monositlerin ekstrasvazasyonu ile dokularda diferansiye olur. Makrofaj polarizasyonunu basitleştirmek için *klasik aktive makrofaj (M1)* ve *alternatif aktive makrofaj (M2)* şeklinde fenotipik ve fonksiyonel açıdan farklı bir terminoloji kullanılmaktadır. Periferik kanda dolaşan monositler ise inflamatuvar uyarı ile çeşitli makrofajlara ve dendritik hücrelere dönüşen *inflamatuvar monositler*, M2 benzeri makrofajlara dönüşen *yerleşik (resident) monositler* olmak üzere iki grupta bulunur (189).

Makrofajlar hücre debrisinin veya mikroorganizmaların fagositozu, immunmodülatör sitokin salınımı, T hücrelere antijen sunumu ve lenfosit aktivasyonunda yardımcı hücre görevi gibi çok sayıda fonksiyonu bulunan doğal (innate) immünite hücreleridir. Bu hücreler inflamasyonun oluşumu ve rezolüsyonu yanı sıra remodelasyon ve tamir döneminde doku homeostazının devamlılığında kritik role sahiptir. Lipopolisakkaritler ve IFN γ gibi klasik aktivatörler ile indüklenen M1 makrofajlar, bakterisidal, antijen sunucu

hücre fonksiyonları yanı sıra naif CD4 pozitif T hücrelerin Th1 efektör hücelere ve Th17 hücelere diferansiasyonunda yardımcıdır. M2 makrofajlar (aktive makrofajlar) ise IL-4, IL-10 ve IL-13 gibi interlökinler ile aktive olur. M2 makrofajlar CD4 pozitif Th2 hücelerin stimülasyonunda ve Treg hücelerin diferansiasyonunda görev alır. M2 makrofajlar, T hücre polarizasyonundaki etkileri sayesinde, B hücelerden antikor üretimi ve CD8 pozitif sitotoksik T hücre/ doğal öldürücü hücre aktivitesinin baskılanmasını sağlamaktadır. Ayrıca M2 makrofajlar, M1 makrofajlara oranla hücrel debrinin temizlenmesi ve anjiogenezin desteklenmesi konusunda daha önemli fonksiyona sahiptir (189).

CD68, makrofajlar tarafından eksprese edilen, lizozomlarla ilişkili, 110 kilodaltonluk bir glikoproteindir. Pek çok benign ve malign histiyositik lezyonda ekspresyonu mevcuttur (180).

CD163 antijeni, 175 kilodaltonluk bir hücre yüzey glikoproteindir. Dokuların çoğunda makrofajlar tarafından eksprese edilmesi yanı sıra atipik fibröz ksantom veya monositik seri kökenli akut lösemilerde de pozitif olabilir. Ancak immatür monositler, alveoler makrofajlar veya mikrogial hücelerde ekspresyon görülmez (180).

Tümör ilişkili makrofajların (TİM), büyüme faktörleri, sitokinler ve proteazlar üreterek tümör gelişimine ve progresyonuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir (23). TİM'in genellikle M2 polarize fenotipte görülen özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir (189). M1 makrofajların ve Th1 hücelerin anti-tümör immün etkisinin inhibisyonu yanı sıra Treg ve Th2 hücelerin aktivasyonunda etkilidir (24). Regülatuar T hücelerin solid tümörlerde anti-tümör aktivitenin etkisini azalttığı ve tümör progresyonu yanı sıra kötü prognozla ilişkili olduğu bilinmektedir (25). Ancak pek çok lenfoid malignitede tümörü infiltre eden regülatuar T hücre artışının iyi prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (26).

CC kemokinler, CCL2 (monosit kemoatraktan protein-1/MCP-1), CCL3 (makrofaj inflamatuvar protein-1 α), CLL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES) ve CCL8 (MCP-2), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), plasental büyüme faktörü (PIGF), koloni stimulan faktör 1 (CSF-1) ve stromal derive faktör 1 (SDF-1/CXCL12) gibi moleküller tümör tarafından salgılanmakta olup monositlerin tümöre devamlı takviyesini sağlamaktadır. Tümörlerde bu faktörlerin düzeylerinin TİM yoğunluğu ile korele olduğu ve genelde kötü klinik sonuçlarla ilişkili bulunduğu tespit edilmiştir (189). Makrofajlar, antikor bağımlı fagositozun önemli mediatörleri olduğundan, anti-CD20 monoklonal antikor (rituximab/obinutuzumab) tedavisine yanıt için makrofajların gerekli olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (190).

TİM'lerin anjiogenez, lenfanjiogenez, tümör invazyonu ve metastazı, immüniteden kaçış ve immunsupresyon mekanizmaları ile tümör gelişimi ve progresyonuna katkıda bulunduğu dair veriler saptanmıştır (189). Nam ve arkadaşlarının çalışmasında, kombine immunokemoterapi ile tedavi edilen DBBHL olgularında, artmış CD163 eksprese eden hücre sayısının ve CD163/ CD68 eksprese eden hücre oranının kötü prognozu öngörmeye etkili olduğu gösterilmiştir (27). McCord ve arkadaşlarının çalışmasında DBBHL'lerde TİM belirteçleri ile PD-L1 arasında korelasyonu destekleyen bulgular saptanmış olmakla birlikte, bu durumun muhtemelen antijen bağımlı fagositozda görevli bir aktive makrofaj tipini yansıttığı ve modern immunokemoterapi ile tedavi edilen hastalarda gözlenen daha iyi klinik sonuçlara katkıda bulunduğu belirtilmiştir (190).

2.15 Programmed Cell Death Protein-1 (PD-1) ve Programmed Death Ligand-1/2 (PD-L1/2) Yolağı

“Programmed cell death protein 1” (PD-1 ya da CD279), CD28 ve CTLA-4 immunoglobulin süper ailesinin bir üyesidir. PD-1, B7 ailesinin ligandları olan PD-L1 (CD274 ya da B7-H1) ve PD-L2 (CD273 ya da B7-DC) ile bağlanır. PD-1, aktive T hücreler, B hücreler, doğal öldürücü hücreler, makrofajlar ve tümörü infiltre eden lenfositlerin (TİL) büyük bir kısmında eksprese edilir (28). PD-L1 ise fizyolojik olarak B hücreler, T hücreler ve makrofajların yüzeyinde ekspresyon gösterirken, PD-L2 APC'ler ve epitelyal dokularda eksprese edilir (191).

PD-L1, PD-1 reseptörüne bağlanarak sitokin üretimini ve T hücrelerinin hücre siklusunda ilerlemesini inhibe etmektedir (29,30). PD-1 ve PD-L1 etkileşimi, T hücre aracılı immün yanıt mekanizmasında önemli bir kontrol noktası görevine sahiptir (31).

Naif T hücreler, TCR ile APC üzerindeki MHC moleküllerinin etkileşimi ile antijeni tanıdıktan sonra aktive olur. Aktive edici sinyaller inhibitör reseptörler olan kontrol noktası molekülleri tarafından kontrol edilmektedir. Kontrol noktası molekülü T hücre aracılı immün yanıtın inhibisyonunda, kronik enfeksiyöz veya inflamatuvar süreçlerin devamlılığında çok önemli bir yere sahiptir (192). PD-1 ve PD-L1'in ekstrasellüler domainlerinin etkileşimi PD-1'de yapısal değişikliği uyarır. Bu değişiklik sonucunda sitoplazmik sinyalizasyon motifleri olan immünoresptör tirozin bazlı inhibitör motifler (ITIMs) ve immünoresptör tirozin bazlı aktivasyon motifler (ITSM) fosforile olur. Fosforile olan sinyalizasyon motifleri ile “Src Homology Region 2-Containing Protein Tyrosine Phosphatase-2” (SHP-2) ve SHP-1

serbestleştirilir. Serbest haldeki SHP1/2 tarafından “Zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70” (ZAP70) defosforile edilir. TCR sinyal yollarının “downstream” üyesi olan defosforile ZAP70, fosfoinositid-3-kinaz (PI3K)/Akt yolağını, RAS/MEK/Erk yolağını ve Protein kinaz C theta yolağını inhibe eder. Sonuçta PD-1 aracılı inhibitör yolak, azalmış T hücre proliferasyonu ve IL-2 üretimi yanı sıra T hücre tüketimine sebep olan T hücre apoptozunu indükler (192).

Normalde immün kontrol noktası, immün yanıtı “down regüle” etmeye yardımcı bir sistemdir, ancak bu mekanizma bazı tümörler tarafından immün kaçış için kullanılmaktadır. İmmün kontrol noktası yolları ile oluşturulan terapötik girişim, immün kontrol noktası blokajı olarak adlandırılmakta olup pek çok tümör tipinde belirgin başarı sağlamıştır. Son dönemde en geniş kapsamda çalışılan kontrol noktası PD-1 ve ligandlarıdır (193).

Pek çok tümörde T hücre aracılı immün yanıtın kaçış için PD-L1 aşırı ekspresyonunun bulunduğu gösterilmiştir (32–34). Solid tümörlerde PD-1 ve PD-L1 blokajı yapan immunoterapi ajanları ile yapılan çalışmalarda elde edilen uzun dönem klinik sonuçlar sebebiyle anti-tümör immünite önem kazanmaktadır (35,36).

2.15.1 Lenfomalarda PD-1 ve PD-L1/ PD-L2 Yolağı

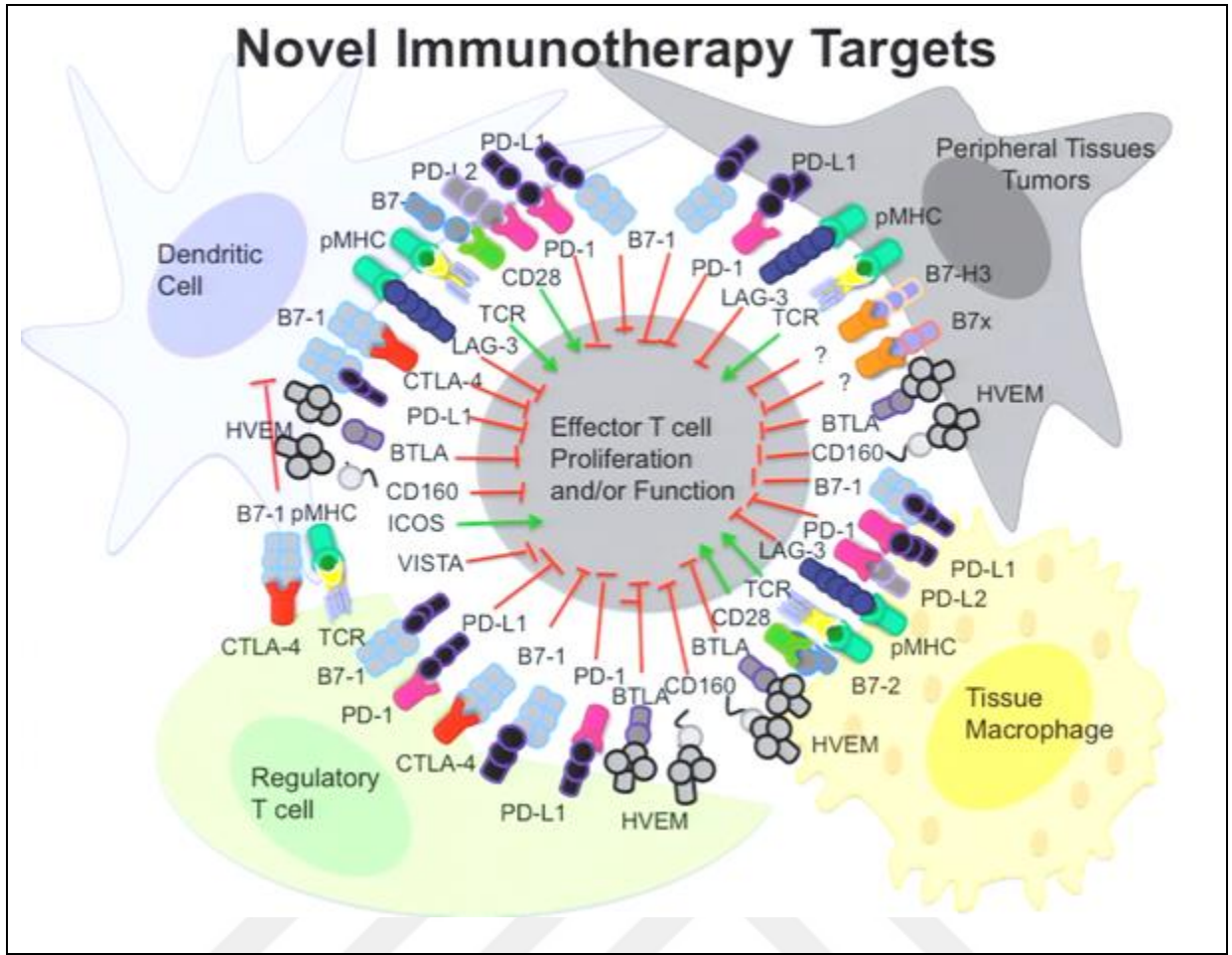
Lenfomalarda PD-1 tümör hücrelerinde sık sık “upregüle” edilir. Folliküler T helper hücrelerden (TFH) köken alan ‘anjioimmunoblastik T hücreli lenfoma’, ‘folliküler T hücreli lenfoma’ ve ‘TFH fenotipinde nodal periferik T hücreli lenfoma’da PD-1 ekspresyonu mevcuttur. Benzer şekilde KLL’deki neoplastik B hücrelerin bir kısmında sık PD-1 “upregülasyonu” gerçekleştirilir. PD-L1 ve PD-L2 ligandları da bazı B ve T hücreli lenfomalarda tümör hücreleri tarafından eksprese edilir. Farklı lenfoma gruplarında PD-L1 blokajının proliferasyonu azaltıcı etkisinin saptanmış olması, NHL patogeneğinde PD-1/PD-L1 ekspresyonunun önemli yeri olduğunu göstermektedir. Efektör T hücrelerdeki PD-1 ve PD-L1/PD-L2 bağlanması ile aktive olan intrasellüler PD-1 sinyal oluşumu, T hücre aktivasyon sinyallerini azaltarak etkin anti-tümör yanıtı inhibe eder. NHL’ların tümör mikroçevresinde PD-1’in efektör T hücrelerde ve PD-L1’in myeloid hücrelerde eksprese edilebilmesi, NHL’de PD-1/PD-L1 etkileşiminin immün kaçış mekanizmasında yer almasını sağlamaktadır. Malign lenfoid hücrelerdeki PD-L1 ve PD-L2 aşırı ekspresyonu, aynı tümörde birden fazla da görülebilen, intrensek ve ekstrensek adaptif immün direnç olarak bahsedilen çok sayıda mekanizmanın sebebi olabilir (191).

2.15.2 Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomada (DBBHL) PD-1 ve PD-L1/ PD-L2 Ekspresyonu

Diffüz büyük B hücreli lenfomada (DBBHL) PD-L1 hem neoplastik B hücrelerde, hem de makrofajlar gibi tümör mikroçevresini oluşturan non-neoplastik hücrelerde eksprese edilebilir (191). Literatürde DBBHL olgularında PD-L1 ekspresyonu %20-30 dolayında bildirilmiş olmakla birlikte, pozitiflik için kabul edilen eşik değerin farklı olması (%5-30 arasında değişen) ve tümör hücreleri yanı sıra tümör mikroçevresinde bulunan diğer hücrelerde de eksprese edilmesi nedeniyle bildirilen pozitiflik oranları oldukça değişkendir (30,191). DBBHL'de PD-L1 düzeyini araştıran çalışmalarda, ABC alt tipinde daha yüksek ekspresyon oranları saptanmıştır. Ancak PD-L2 ekspresyonu detaylı olarak belgelenmemiş olmakla birlikte, çoğu NHL'de ekspresyon izlenmemiştir. PD-L1'in aksine hemen daima tümör mikroçevresini oluşturan hücrelerde ve incelenen tümör alanına göre değişen sayıda hücrede PD-1 eksprese edilmektedir. DBBHL'de tümör hücrelerinde düşük düzeyde yüzey PD-1 ekspresyonu görülmekle birlikte olguların bir kısmında PD-1 ve PD-L1 koekspresyonu belirlenmiştir (191).

2.15.3 Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomada (DBBHL) PD-1 ve PD-L1/ PD-L2 Ekspresyonunun Prognoz İlişkisi

DBBHL'da PD-1 ve PD-L1 ekspresyonunun prognostik önemi olduğu gösterilmiştir. Kiyasu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada PD-L1 pozitif hastaların toplam sağkalım oranlarının, PD-L1 negatif olan hastalara oranla daha düşük olduğu saptanmıştır. Ayrıca PD-L1 pozitif tümör hücreleri ve düşük oranda PD-1 pozitif TİL saptanan hastalar, PD-L1 negatif tümör hücreleri ve yüksek oranda PD-1 pozitif TİL saptanan hastalarla karşılaştırıldığında daha kötü prognoza sahip oldukları belirlenmiştir (30). Tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunu değerlendiren çalışmalarda genelde, DBBHL alt tipleri arasında en kötü prognoza sahip olan ABC grubundaki hastalarda görülen bir bulgu olarak bahsedilmektedir (191). Literatürde yer alan bazı çalışmalarda yüksek PD-1 ekspresyonu gösteren TİL varlığı ile daha iyi sağkalım oranları arasında korelasyon saptanmıştır (194).



Şekil 4: İmmunoterapi için hedef moleküller

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 DBBHL Olgularının Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda, 2009-2016 yılları arasındaki arşiv kayıtlarına ait veriler değerlendirilerek, “diffüz büyük B hücreli lenfoma, spesifik edilemeyen (NOS)” tanısı almış, ardışık 562 olgu arasından, aşağıda yer alan kriterlere sahip olgular çalışma dışı bırakılarak, parafin blok ve preparatlarına ulaşılabilen toplam 163 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen olgular arasında diğer hastanelerden merkezimize konsülte edilen 23 adet materyal de bulunmaktadır.

Aşağıda yer alan özellikleri bulunduran olgular çalışmaya dahil edilmemiştir.

- Spesifik tanı gruplarında değerlendirilen büyük B hücreli lenfoma hastalarına ait biyopsi materyalleri,
- Klinik özgeçmişinde düşük dereceli BHL tanısı bulunan ve DBBHL transformasyonu olarak değerlendirilen olgular,
- Parafin bloklarında küçük boyutlarda doku örneği kaldığı için seri kesitlerde kaybedilme riski taşıyan biyopsi materyalleri,
- PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68 ve CD163 immunhistokimyasal boyamaları için hazırlanan kesitlerde tümör dokusu dökülmüş olan biyopsi materyalleri,
- Klinik takip ve hastalık progresyonuna ilişkin verilere ulaşılamayan olgular

3.2 Etik Kurul Onayı

Çalışmamıza yönelik Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 22.02.2019 tarihinde 19-2. IT/29 karar numarasıyla etik kurul onayı alınmıştır.

3.3 Mikroskopik Değerlendirme

Çalışma kapsamında yer alan 163 olguya ait arşivimizde yer alan H&E boyalı preparatlar ve immunhistokimyasal belirteçlere ait preparatlar tekrar değerlendirilerek DSÖ 2016 sınıflaması ile tanımlar korele edildi.

Olguların tamamı arşivimizde bulunan CD3, CD20, BCL-2, BCL-6, MUM1, CD10, MYC, Ki67 immunhistokimyasal belirteçlerine ait preparatları ve EBER-CISH yöntemi ile EBV enfeksiyonunun varlığı açısından tekrar değerlendirildi.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2016 sınıflamasında yer aldığı üzere tümör hücrelerinde; CD10, BCL6, MUM1 için hücrelerin %30'unda veya daha fazlasında ekspresyon olması, MYC için hücrelerin %40'ında veya daha fazlasında ekspresyon olması, BCL-2 için hücrelerin %50'sinde veya daha fazlasında ekspresyon olması durumunda bu belirteçler pozitif olarak değerlendirildi. Ki67 proliferasyon indeksi, tümör hücrelerinin pozitiflik oranına göre belirlendi. EBER-CISH yöntemi ile tümör hücrelerinde EBV pozitifliği incelendi.

Olgulara moleküler alt tiplerin belirlenmesine yönelik bir yöntem olan Hans algoritması uygulandı. Hans algoritmasında CD10, BCL- 6 ve MUM1 immunhistokimyasal belirteçleri yukarıda belirtildiği üzere tümör hücrelerinde bu belirteçlerin ekspresyon oranlarına göre pozitif ve negatif olarak değerlendirilmesi yöntemi uygulandı. Tümör hücrelerinde yalnızca CD10 pozitifliği ya da hem CD10 hem BCL6 pozitifliği varlığında GCB alt tipi olarak belirtildi. Tümör hücrelerinde CD10 negatifliği ve BCL6 pozitifliği izlenmesi durumunda MUM1 ekspresyon durumuna göre; MUM1 pozitif olgular ABC, MUM1 negatif olgular GCB alt tipi olarak kabul edildi. CD10, BCL6 ve MUM1 belirteçlerinin üçünün de negatif saptandığı olgular ABC alt tipinde değerlendirildi.

3.4 “Doku Mikroarray (DMA)” Tekniği ile Parafin Blokların Hazırlanması

“Doku mikroarray (DMA)” tekniği ile canlı tümör dokusu içeren birden fazla parafin bloğu bulunan 132 olguya ait arşivde bulunan preparatlardan canlı tümör dokusunun en yoğun olduğu, tümörü en iyi temsil eden alanlar işaretlendi. İşaretlenen preparatlara ait arşiv bloklarından (donör) Unitma manuel DMA hazırlama setinde bulunan blok tutucu yardımı ile 5 mm çapında 12 çukur içeren alıcı parafin blok hazırlandı. İşaretli tümör alanlarını içeren 5 mm çapındaki örnekler punch aparatı ile donör bloklardan çıkarılarak alıcı bloğa yerleştirildi. Alıcı blokta birinci sıraya immunhistokimyasal belirteçler için kontrol dokusu olarak da

belirlenen apendiks dokusu gömüldü. Diğer 11 çukura belirlenen olgulara ait işaretli tümör dokuları gömüldü. Her bir blokta 11 olguya ait tümör dokusu içeren toplam 12 adet DMA tekniği ile hazırlanmış alıcı blok elde edildi. Alıcı bloklar 10 dakika boyunca 60° 'lik etüvde bekletildi. Daha sonra alıcı bloklardan PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68 ve CD163 immunhistokimyasal belirteçlerine yönelik incelemeler için üç mikron kalınlığında kesitler alındı. İmmunhistokimyasal yöntem sonrasında kesitte tümör dokusu kalmayan ya da teknik nedenlerle dökülen olgular için DMA yönteminin uygulandığı donör bloklardan tekrar kesit alınarak işlem tekrarlandı. DMA tekniği açısından uygun olmayan 31 olgu ise arşivde bulunan parafin bloklarından, PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68 ve CD163 immunhistokimyasal belirteçlerine yönelik 3 mikron kalınlığında kesitler alınarak değerlendirildi.



Şekil 5: Doku "mikroarray" yöntemi ile hazırlanan bloklar ve immunhistokimyasal belirteçlere ait preparatlar

3.5 PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68 ve CD163 İmmunhistokimyasal Belirteçlerinin Boyama Yöntemleri

PD-L1 antikoruna yönelik pozitif ve negatif kontrol dokusu olarak tonsil belirlendi. PD-L1 pozitifliği açısından daha önceden bu belirtecin pozitif olduğu belirlenmiş olan diffüz büyük B hücreli lenfoma olgusuna ait parafin bloklar kullanıldı.

PD-1 antikoruna yönelik pozitif ve negatif kontrol dokusu olarak tonsil belirlendi. PD-1 pozitifliği açısından daha önceden bu belirtecin pozitif olduğu belirlenmiş olan anjioimmünoblastik T hücreli lenfoma tanısı almış bir lenf nodülüne ait parafin bloklar kullanıldı.

FOXP3 antikoruna yönelik pozitif ve negatif kontrol dokusu olarak tonsil belirlendi. FOXP3 pozitifliği açısından daha önceden bu belirtecin pozitif olduğu belirlenmiş olan klasik Hodgkin lenfoma tanılı bir olguya ait parafin bloklar seçildi.

CD4, CD8, CD68, CD163 antikorları için pozitif ve negatif kontrol dokusu olarak tonsil belirlendi.

DMA tekniği ile hazırlanan toplam 132 olguya ait dokuları içeren 12 alıcı blok ve DMA tekniğine uygun olmayan 31 olguya ait arşivimizde bulunan formalin ile tespit olmuş, parafine gömülü doku bloklarından 3 mikron kalınlığına kesitler hazırlandı. Hazırlanan kesitler pozitif yüklü lamlar (Thermo Scientific, Menzel Glaser, Superfrost Plus ca./env./approx. 25x75x1,0 mm) üzerine alındıktan sonra 65°C'lik etüvde bir gece bekletildi ve kurutuldu.

PD-1, FOXP3, CD4, CD8 ve CD163 immunhistokimyasal incelemeleri için kurutulmuş preparatlar Ventana Medical System-Benchmark XT/ISH Staining module yerleştirilerek Ultraview Universal DAB kiti ve primer antikorlar kullanılarak aşağıdaki prosedürler uygulandı:

1. EZ Prep solüsyonu içerisinde 75°C'de 8 dakika boyunca deparafinizasyon
2. EDTA bazlı buffer ph:7,8 ile 95°C'de 60 dakika boyunca antijen açığa çıkarma işlemi
3. UV INHIBITOR solüsyonu ile 37°C'de 4 dakika boyunca inhibitör bloklama işlemi
4. Primer antikor inkübasyonu
 - PD-1 (klon: NAT105, kullanıma hazır, Cell Marque) için 60 dakika primer antikor inkübasyonu
 - FOXP3 (klon: EP340, konsantre (1/100), Epitomics) için 60 dakika primer antikor inkübasyonu
 - CD4 (klon: SP35, kullanıma hazır, Ventana) için 24 dakika primer antikor inkübasyonu
 - CD8 (klon: 1A5, konsantre (1/30), Leica) için 32 dakika primer antikor inkübasyonu
 - CD163 (klon: MRQ-26, kullanıma hazır, Cell Marque) için 32 dakika primer antikor inkübasyonu
5. 8 dakika boyunca Ultraview DAB + Ultraview DAB H2O2 inkübasyonu

6. 8 dakika boyunca hematoksilin ile zıt boyanma
7. 4 dakika boyunca BLUING REAGENT ile inkübasyon

Yukarıda belirtilen her basamağın geçişlerinde ve son aşamada Reaction buffer ile durulama yapıldı.

CD68 immunhistokimyasal incelemesi için kurutulan preparatlar Ventana Medical System-Benchmark XT/ISH Staining module yerleştirilerek Ultraview Universal DAB kiti ve primer antikolar kullanılarak aşağıdaki prosedürler uygulandı:

1. EZ Prep solüsyonu içerisinde 75°C'de 8 dakika boyunca deparafinizasyon
2. EDTA bazlı buffer ph:7,8 ile 95°C'de 30 dakika boyunca antijen açığa çıkarma işlemi
3. UV INHIBITOR solüsyonu ile 37°C'de 4 dakika boyunca inhibitör bloklama işlemi
4. Primer antikor inkübasyonu
 - CD68 (klon: KP-1, kullanıma hazır, Ventana) için 24 dakika primer antikor inkübasyonu
5. 8 dakika boyunca Ultraview DAB + Ultraview DAB H2O2 inkübasyonu
6. 8 dakika boyunca hematoksilin ile zıt boyanma
7. 4 dakika boyunca BLUING REAGENT ile inkübasyon

Yukarıda belirtilen her basamağın geçişlerinde ve son aşamada Reaction buffer ile durulama yapıldı.

PD-L1 immunhistokimyasal incelemesi için kurutulan preparatlar Ventana Medical System-Benchmark XT/ISH Staining module yerleştirilerek Optiview Universal DAB kiti ve primer antikolar kullanılarak aşağıdaki prosedürler uygulandı:

1. EZ Prep solüsyonu içerisinde 75°C'de 8 dakika boyunca deparafinizasyon
2. EDTA bazlı buffer ph:7,8 ile 95°C'de 64 dakika boyunca antijen açığa çıkarma işlemi
3. UV INHIBITOR solüsyonu ile 37°C'de 4 dakika boyunca inhibitör bloklama işlemi
4. Primer antikor inkübasyonu

- PD-L1 (klon: SP142, kullanıma hazır, Ventana) için 60 dakika primer antikor inkübasyonu

5. Birer kez dörder dakika amplifier A ve B uygulaması
6. 8 dakika boyunca Ultraview DAB + Ultraview DAB H2O2 inkübasyonu
7. 8 dakika boyunca hematoksilin ile zıt boyanma
8. 4 dakika boyunca BLUING REAGENT ile inkübasyon

Yukarıda belirtilen her basamağın geçişlerinde ve son aşamada Reaction buffer ile durulama yapıldı.

Makineden çıkarılan preparatlar sabunlu suyla yıkanıp durulandı. Saf alkolde 3 kez 3 dakika boyunca bekletilerek sudan kurtarma işlemi uygulandı. Ardından ksilende 1 dakika bekletilerek balsam ile kapatma işlemi yapıldı.

3.6 İmmünohistokimyasal Belirteçlerin Değerlendirilmesi

PD-L1 immünohistokimyasal belirteci membranöz ve/veya sitoplazmik boyanma varlığında, PD-1 immünohistokimyasal belirteci ise yalnızca sitoplazmik boyanma varlığında pozitif olarak değerlendirildi. FOXP3 immünohistokimyasal belirteci nükleer ekspresyon durumunda pozitif olarak kabul edildi. CD4 ve CD8 immünohistokimyasal belirteçleri için membranöz boyanma pozitiflik yönünde değerlendirildi. CD68 (KP1 klonu) immünohistokimyasal belirteci için sitoplazmik boyanma gösteren hücreler pozitif kabul edildi. CD163 immünohistokimyasal belirteciye yönelik değerlendirmede membranöz boyanma gösteren hücrelerde pozitiflik değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal belirteçlere yönelik değerlendirme üç patolog (NEÖ, DD, GB) tarafından yapıldı. H/E preparatlar ile tümör ve tümör mikroçevresi gözden geçirildi. PD-L1 öncelikle tümör hücrelerinde değerlendirildi. PD-L1 immünohistokimyasal belirteci ile membranöz ve/veya sitoplazmik pozitiflik saptanan tümör hücrelerinin tüm tümör hücrelerine oranı belirlendi. PD-L1'in tek bir tümör hücresindeki boyanma yoğunluğu da; "boyanma yok:0, zayıf boyanma:1, orta şiddette boyanma:2, kuvvetli boyanma:3" şeklinde değerlendirilip pozitif boyanan tüm tümör hücrelerinin ortalaması alındı ve boyanma şiddeti olarak belirlendi. Tümör hücresinde izlenen sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma oranlarına göre beş grupta değerlendirilerek boyanma oranı %1-5:skor 1, %6-9: skor 2, %10-25: skor 3, %26-50: skor 4, %51-100: skor 5 şeklinde skorlandı. Daha sonra tümör

mikroçevresinde PD-L1 ile pozitif boyanan hücrelerin tüm mikroçevreye oranı değerlendirildi. FOXP3 immunhistokimyasal belirteci için tümör mikroçevresinde nükleer ekspresyon gösteren T hücrelerin tüm mikroçevreyi oluşturan hücelere oranı değerlendirildi. Ayrıca mikroçevre dışında tümör hücrelerinde FOXP3 ekspresyonu bulunan ve bulunmayan olgular olarak da değerlendirme yapıldı.

PD-1 immunhistokimyasal belirteci tümör hücrelerinde değerlendirildi. Sitoplazmik boyanma gösteren tümör hücrelerinin, tüm tümör hücrelerine oranı hesaplandı. Tümör mikroçevresinde PD-1 ile sitoplazmik boyanma izlenen hücrelerin tüm tümör mikroçevresini oluşturan hücelere oranı saptandı.

Tümör mikroçevresinde CD4 ve CD8 immunhistokimyasal belirteçleri, CD3 ile T lenfositlerin genel dağılımı değerlendirildikten sonra sırası ile gözden geçirildi. CD4 pozitif ve CD8 pozitif T lenfositlerin oranı hesaplandı.

CD68 (KP1 klonu) immunhistokimyasal belirteci DMA tekniği ile hazırlanan alıcı bloklarda yer alan her dokunun değerlendirmeye alınan tüm alanı ve DMA tekniğine uygun olmayan tüm olgulardan hazırlanan kesitin tüm alanı değerlendirildikten sonra pozitif olan hücrelerin en yoğun olduğu alandaki hücreler sayılarak 1 büyük büyütme alanında (BBA) CD68 pozitif hücre sayısı hesaplandı. Ayrıca CD68 pozitif hücrelerin tüm mikroçevreyi oluşturan hücelere oranı saptandı.

CD163 immunhistokimyasal belirteci DMA tekniği ile hazırlanan alıcı bloklarda yer alan her dokunun değerlendirmeye alınan tüm alanı ve DMA tekniğine uygun olmayan tüm olgulardan hazırlanan kesitin tüm alanı değerlendirildikten sonra pozitif olan hücrelerin en yoğun olduğu alandaki hücreler sayılarak 1 büyük büyütme alanında (BBA) CD163 pozitif hücre sayısı hesaplandı. Ayrıca CD163 pozitif hücrelerin tüm mikroçevreyi oluşturan hücelere oranı saptandı.

3.7 Progresyon, Takip ve Sağkalım Verilerinin Değerlendirilmesi

Hastaların progresyon, takip ve sağkalım durumlarına ait verilerine hastanemizin arşivinde bulunan hasta dosyalarının taranması, elektronik hasta dosyalarının taranması ve hasta ya da hasta yakınlarına sistemde kayıtlı telefonlar ile görüşülerek bilgi alınması yöntemleri ile ulaşıldı.

3.8 Biyoistatistiksel Analiz

Çalışmaya ait istatistiksel analizler için SPSS IBM (Sürüm:25.0) paket program kullanılmıştır. “Ki-kare” ve “Fisher’s exact test” ile kategorik değişkenler; “Student’s T test” ile normal dağılımlı numerik değişkenler; “Spearman’s korelasyon katsayısı” ve “Mann-Whitney U testi” ile diğer değişkenler karşılaştırılmıştır. “Kaplan-Meier” testi, “Log-Rank (Mantel- Cox)” testi ve “Cox Regresyon” analizi ile sağkalım analizleri değerlendirilmiştir. Analizlerin tamamı için p değeri 0,05’in altında olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

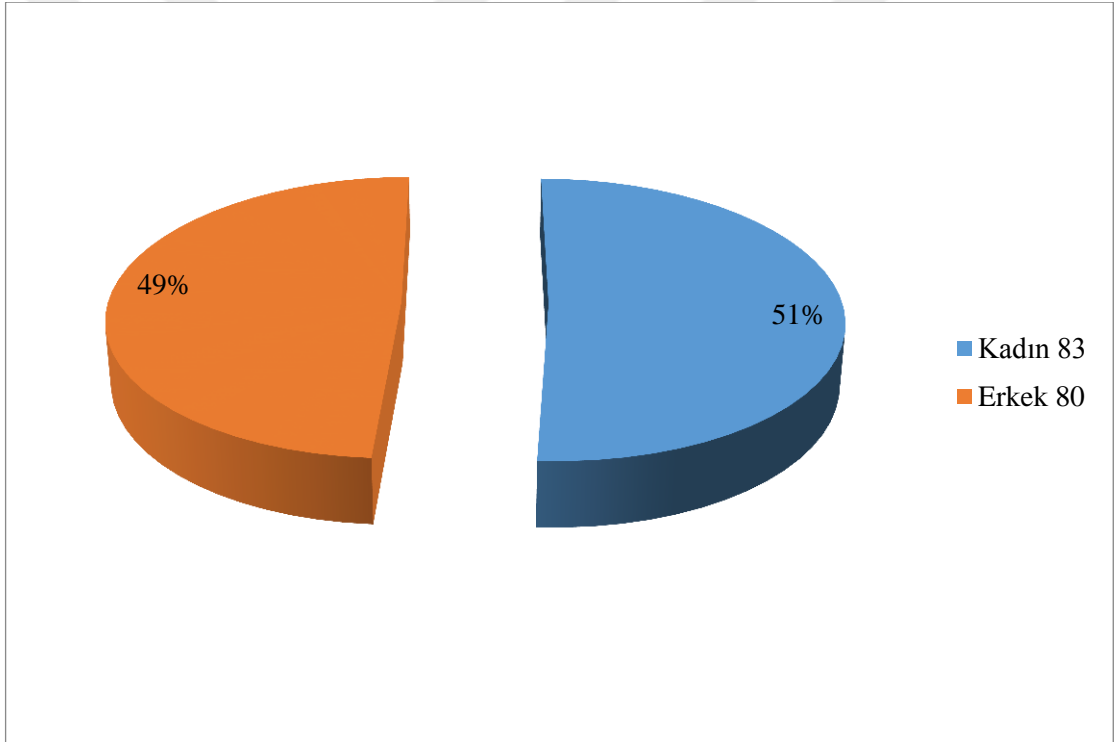


4. BULGULAR

Çalışmamızda “DBBHL, spesifiye edilemeyen (NOS)” tanılı toplam 163 olgu değerlendirildi.

4.1 Tanı Yaşı ve Cinsiyet

Olguların tanı aldığı dönemdeki medyan yaşı 62 olup tanı yaşı aralıkları 13 ile 92 yaş arasında değişmektedir. Olguların 83’ü (%50,9) kadın, 80’i (%49,1) erkek olarak belirlendi.



Şekil 6: Çalışmaya dahil edilen olguların kadın ve erkek oranı

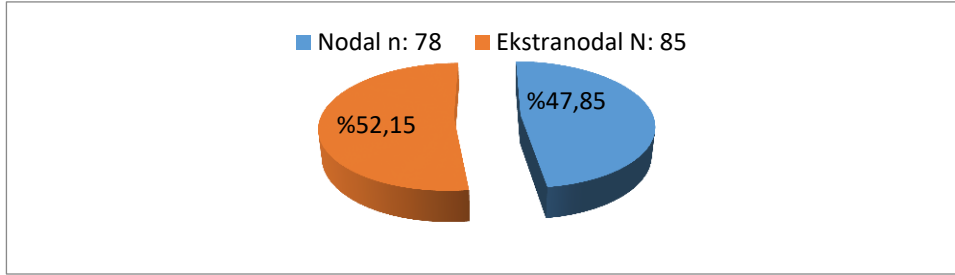
Tablo 4: Tümörde ve mikroçevresinde PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68, CD163 ekspresyonu ile cinsiyet arasındaki ilişki

İmmunhistokimyasal Belirteçler	Cinsiyet		
	Kadın	Erkek	P değeri
Tümörde PD-L1 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	7,5	6,3	0,633
Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	5,5	8,5	0,066
Tümörde PD-1 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	3,6	0,5	0,322
Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	15,6	14,1	0,717
Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	13,3	11,6	0,189
Tümör mikroçevresinde CD4 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	49,7	43,1	0,106
Tümör mikroçevresinde CD8 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	50,4	56,9	0,114
Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	33,1	31,1	0,577
Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre sayısı (n=ortalama değer)	47,9	47,0	0,628
Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	30,5	33,4	0,518
Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı (n=ortalama değer)	41,6	40,6	0,776
Tümörde FOXP3 ekspresyonu (olgu sayısı ve oranı)	n=23 %28,8	n=22 %26,5	0,749

4.2 Tümörün Lokalizasyonu

Olgular tümör lokalizasyonu açısından ele alındığında olguların 78 olguda (%47,9) nodal tutulum, 85 olguda (%52,1) ektranodal tutulum saptandı. Nodal tutulum bölgeleri arasında, tüm tutulum bölgelerinin %17,8'ini oluşturan baş ve boyun yerleşimli lenf nodülleri en sık tümör tutulum bölgesi olarak saptanmışken, diğer nodal tutulum bölgeleri sıklık sırasına göre; inguinal, aksiller, supraklaviküler ve intraabdominal lenf nodülü olarak belirlendi. En sık tutulum saptanan ektranodal lokalizasyonlar sıklık sırasına göre;

gastrointestinal traktüs, baş-boyun bölgesi ektranodal yumuşak doku ve tonsil olarak bulundu.



Şekil 7: Tutulum bölgesine göre olgu sayı ve oranları

Tablo 5: DBBHL olgularının nodal ve ektranodal tutulum bölgelerinin sayı ve oranı

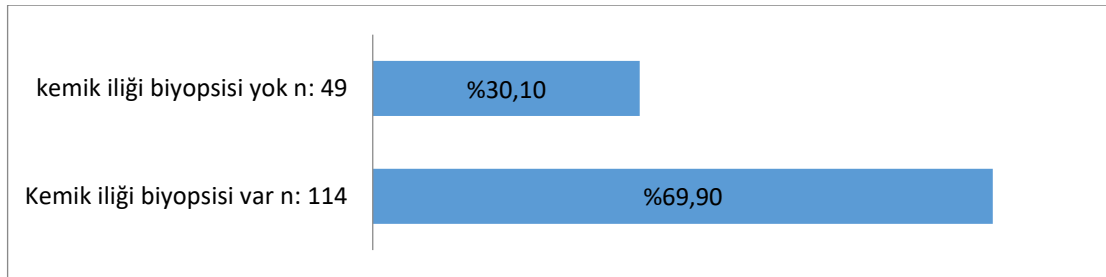
Lokalizasyon	Sayı (n)	Oran (%)
Baş-Boyun Lenf Nodülü	29	17,8
Aksiller Lenf Nodülü	14	8,6
Supraklaviküler Lenf Nodülü	5	3,1
Abdominal Lenf Nodülü	2	1,2
İnguinal Lenf Nodülü	24	14,7
Gastrointestinal traktüs	14	8,6
Karaciğer	3	1,8
Dalak	3	1,8
Pankreas	1	0,6
Akciğer ve Bronş	1	0,6
Bas Boyun Bölgesi Ekstranodal	14	8,6
Yumuşak Doku Gövde/Ekstremitte	7	4,3
İntraabdominal Ekstranodal Tutulum	7	4,3
Kemik	7	4,3
Tonsil	12	7,4
Testis	11	6,7
Spinal Kord	2	1,2
Tiroid	3	1,8
Meme	2	1,2
Sürrenal	1	0,6
Mesane	1	0,6
Total	163	100,0

Tablo 6: Tümörde ve mikroçevresinde PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68, CD163 ekspresyonu ile tutulum bölgesi arasındaki ilişki

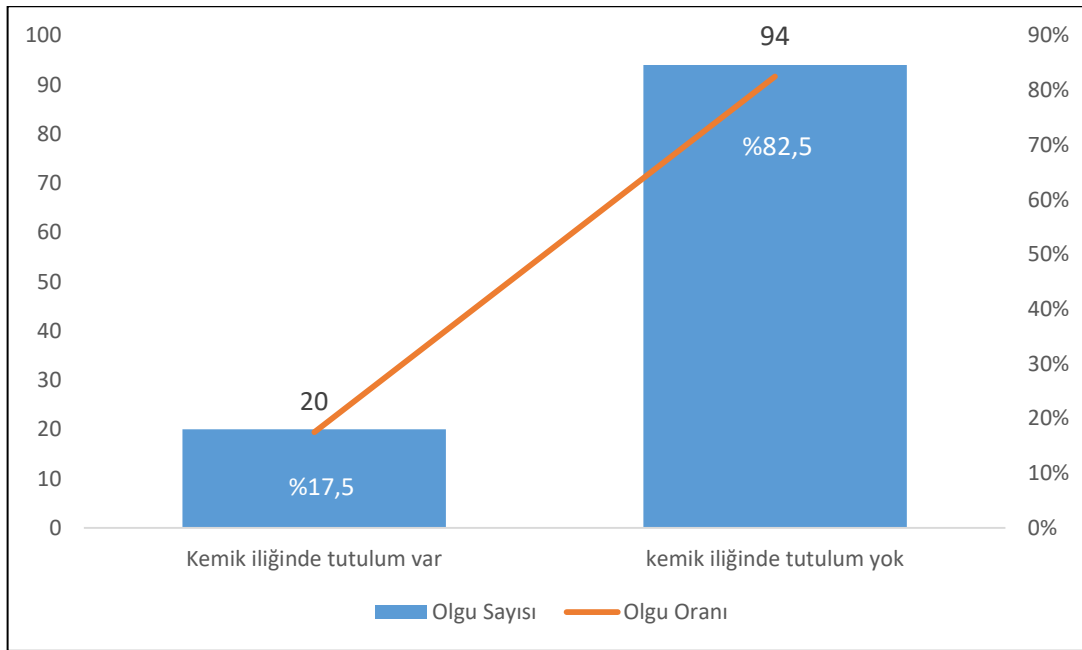
İmmünohistokimyasal Belirteç	Tutulmuş Bölgesi		
	Nodal	Ekstranodal	P değeri
Tümörde PD-L1 ekspresyon oranı (%)	10,2	3,9	0,001
Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı (%)	10,0	4,2	0,013
Tümörde PD-1 ekspresyon oranı (%)	2,6	1,6	0,921
Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyon oranı (%)	20,0	10,1	0,052
Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyon oranı (%)	14,4	10,8	0,634
Tümör mikroçevresinde CD4 ekspresyon oranı (%)	45,1	47,6	0,584
Tümör mikroçevresinde CD8 ekspresyon oranı (%)	54,9	52,5	0,599
Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyon oranı (%)	32,7	31,6	0,903
Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre sayısı (n)	49,6	45,4	0,623
Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyon oranı (%)	32,7	31,2	0,954
Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı (n)	43,4	39,0	0,789
Tümörde FOXP3 ekspresyonu (olgu sayısı ve oranı)	n=24 %30,8	n=21 %24,7	0,387

4.3 Kemik İliği Tutulumu

Olguların 114'ünün (%69,9) arşivimizde evreleme amaçlı yapılmış kemik iliği biyopsisine dair kaydı bulunmakta olup kemik iliği biyopsisi bulunan olguların 20'sinde (%17,5) DBBHL infiltrasyonu mevcuttu.



Şekil 8: Kemik iliği biyopsisi bulunan olgular



Şekil 9: Kemik iliği tutulumu bulunan olgu sayısı ve oranı

Tablo 7: Tümörde ve mikroçevresinde PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68, CD163 ekspresyonu ile kemik iliği tutulumu arasındaki ilişki

İmmunhistokimyasal Belirteç	Kemik iliği tutulumu		
	Var	Yok	p değeri
Tümörde PD-L1 ekspresyon oranı (%)	11,2	8,4	0,416
Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı (%)	6,5	7,0	0,836
Tümörde PD-1 ekspresyon oranı (%)	2,0	2,1	0,485
Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyon oranı (%)	20,4	16,7	0,937
Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyon oranı (%)	11,0	14,8	0,297
Tümör mikroçevresinde CD4 ekspresyon oranı (%)	37,8	50,6	<u>0,042</u>
Tümör mikroçevresinde CD8 ekspresyon oranı (%)	62,3	49,5	<u>0,045</u>
Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyon oranı (%)	35,2	31,8	0,979
Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre sayısı (n)	53,9	46,6	0,955
Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyon oranı (%)	38,0	30,5	0,328
Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı (n)	54,5	37,4	0,148
Tümörde FOXP3 ekspresyonu (olgu sayısı ve oranı)	n=6 %30	n= 23 %24,5	0,606

4.4 Olguların Özgeçmişinde Saptanan Diğer Maligniteler

Çalışmada yer alan olguların elektronik hasta dosyası ve arşiv dosyası taramaları sonucunda “DBBHL, NOS” tanısı dışında bir olguda hematolojik, altı olguda non-hematolojik malignite bulunduğu tespit edildi. Olguların birinin DBBHL tanısı aldıktan sekiz yıl sonra inguinal lenf nodülünde “germinal merkezlerin progresif transformasyonu” tanısı aldığı, geçmişinde non-hematolojik malignite tanısı olan diğer olgulardan birinin deri biyopsisinde bazal hücreli karsinom, bir olgunun deri biyopsisinde skuamoz hücreli karsinoma in situ (Bowen hastalığı), iki olgunun kolon adenokarsinomu, bir olgunun memede invaziv duktal karsinom, bir olgunun da tiroidin papiller mikrokarsinomu tanıları aldığı belirlendi.

4.5 Serum LDH Düzeyi

Olguların tanı aldıkları dönemde ölçülen serum LDH düzeyleri değerlendirildi. Laboratuvar kayıtlarına ve hasta dosyalarına ulaşılabilen toplam 157 olgunun serum LDH düzeyi 102 U/L ile 6381 U/L arasında değişmekte olup medyan düzey 399 U/L olarak hesaplandı.

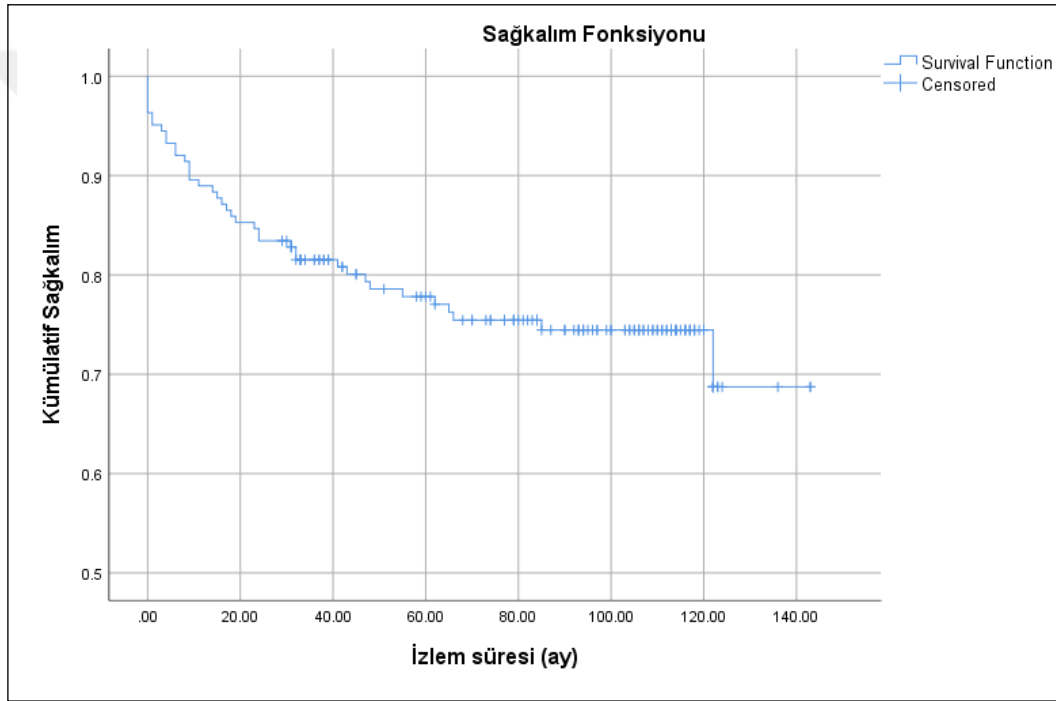
Tablo 8: Tümörde ve mikroçevresinde PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68, CD163 ekspresyonu ile serum LDH düzeyi arasındaki ilişki

İmmunhistokimyasal Belirteçler	Serum LDH Düzeyi (U/L)		
	p değeri	r değeri	İstatistiksel Anlamlı İlişki
Tümörde PD-L1 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	0,125	0,123	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	0,216	0,099	saptanmadı
Tümörde PD-1 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	0,052	-0,155	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	0,317	-0,080	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	0,350	-0,075	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD4 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	0,460	-0,059	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD8 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	0,429	0,064	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	0,874	0,013	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre sayısı (n=ortalama değer)	0,626	0,039	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	0,181	0,107	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı (n=ortalama değer)	0,135	0,120	saptanmadı

4.6 Takip Süresi, Progresyon ve Sağkalım

Çalışmada olguların medyan izlem süresi 81 ay (min-maks:1 ay-143 ay) olarak belirlendi. Çalışmaya dahil edilen 163 olgunun 40'nın (%24,5) öldüğü, 29'unda (%17,8) biyopsi ya da PET/BT ile saptanan hastalık progresyonu olduğu belirlendi.

Toplam 163 olgunun altısında genel sağkalım süresi bir aydan kısa olduğu için bu olgular progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalım değerlendirmelerine dahil edilmeyerek 157 olgunun progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalım verilerine ilişkin değerlendirme “Kaplan-Meier” sağkalım analizi ve “Cox regresyon” testi ile yapıldı. Bu olguların genel sağkalım medyan değeri $115,7 \pm 4,2$ ay; progresyonsuz sağkalım medyan değeri $103,8 \pm 3,4$ ay olarak saptandı. Olguların bir yıllık genel sağkalım oranı %92,4; üç yıllık genel sağkalım oranı %84,6 ve beş yıllık genel sağkalım oranı %80 olarak hesaplandı. Olguların bir yıllık progresyonsuz sağkalım oranı %87,3; üç yıllık progresyonsuz sağkalım oranı %77 ve beş yıllık progresyonsuz sağkalım oranı %73,1 olarak hesaplandı.

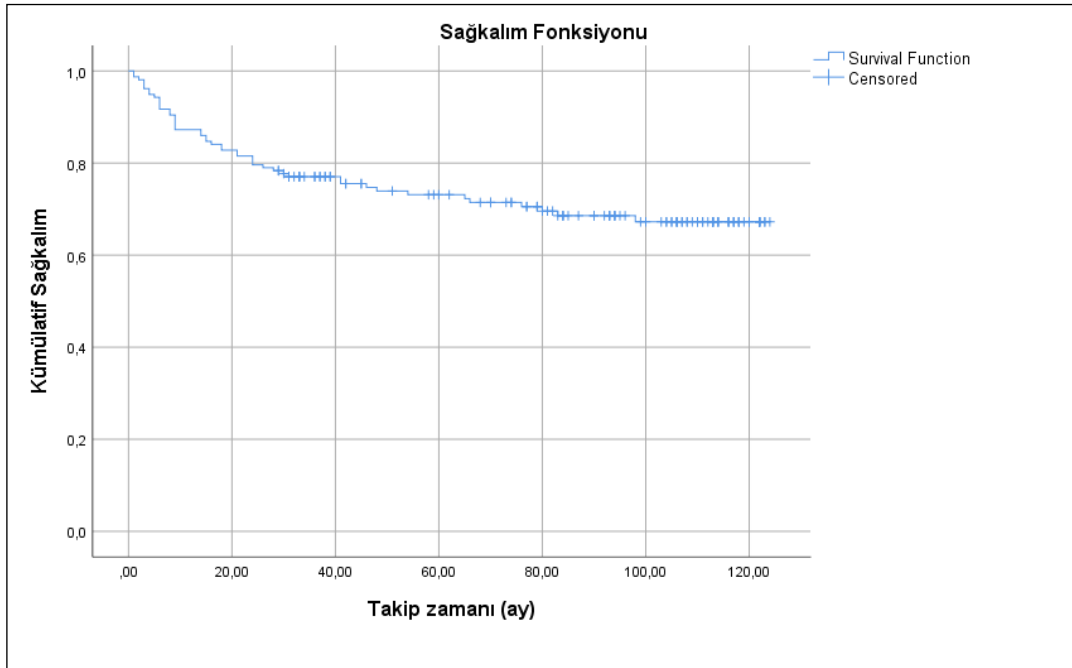


Şekil 10: Kaplan- Meier genel sağkalım analizi

Progresyonsuz sağkalım ile serum LDH düzeyi, Ki67 proliferasyon indeksi, cinsiyet, nodal ya da ektranodal tutulum, kemik iliği tutulumu, Hans algoritması, BCL2 immunhistokimyasal incelemesi arasında anlamlı ilişki bulunmadı (sırasıyla $p=0,068$, $p=0,553$, $p=0,631$, $p=0,988$, $p=0,910$, $p=0,305$, $p=0,639$). Progresyonsuz sağkalım ile BCL6, MYC, CD10 ve MUM1 immunhistokimyasal incelemeleri arasında anlamlı ilişki bulunmadı (sırasıyla $p=0,722$, $p=0,566$, $p=0,083$, $p=0,436$).

Progresyonsuz sağkalım ile immunhistokimyasal yöntemle tümör mikroçevresinde CD4 pozitif T hücre oranı ve CD8 pozitif T hücre oranı arasındaki ilişki değerlendirildi. Tümör mikroçevresinde CD4 pozitif T hücre oranı, progresyon saptanan olgularda ortalama $38,8 \pm 22,6$ (min-maks:%5-%90), progresyon bulunmayan olgularda $48,1 \pm 25$ (min-maks:%5- %80) olarak bulundu. Tümör mikroçevresinde CD4 pozitif hücre oranı ile progresyonsuz sağkalım arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p=0,068$). Tümör mikroçevresinde CD8 pozitif T hücre oranı, progresyon saptanan olgularda ortalama $61,6 \pm 22,6$ (min-maks:%10-%95), progresyon bulunmayan olgularda $51,9 \pm 25$ (min-maks:%20-%95) olarak bulundu. Tümör mikroçevresinde CD8 pozitif hücre oranı ile progresyonsuz sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0,055$).

Takip süresince öldüğü bilinen hastaların ortalama tanı yaşı $68,6 \pm 15,2$; sağ olan hastaların $56,8 \pm 15,3$ olarak hesaplandı. “Cox regresyon” analizi ile değerlendirme yapıldığında tanı yaşının artışının genel sağkalım açısından 1,066 kat artmış riske sahip olduğu bulundu (%95 Güven Aralığı:1,035-1,098) ($p<0,001$). Ayrıca tanı yaşı ile progresyonsuz sağkalım ilişkisinin değerlendirilmesi sonucunda artan tanı yaşının progresyonsuz sağkalım açısından 1,036 kat artmış riske sahip olduğu belirlendi (Güven Aralığı:1,002-1,070) ($p=0,034$).



Şekil 11: Kaplan-Meier progresyonsuz sağkalım analizi

Tablo 9: Tanı yaşı ile sağkalım ilişkisi

Sağkalım Analizi	Ortalama tanı yaşı (yıl)		Hazard Oranı	p değeri	%95 GA
	Sağ hasta	Eksitus			
Genel Sağkalım Analizi	Sağ hasta 56,8	Eksitus 68,6	1,066	<0,001	1,035-1,098
Progresyonsuz Sağkalım Analizi	Sağ hasta 59,4	Progresyonlu Hasta 60,9	1,036	0,034	1,002-1,070

Tablo 10: Klinik ve patolojik parametreler ile sağkalım ilişkisi

Klinik ve patolojik özellikler		Genel Sağkalım		Progresyonsuz Sağkalım	
		Medyan süre (ay)	p değeri	Medyan süre (ay)	p değeri
Cinsiyet	Kadın	107,9	0,458	90,9	0,666
	Erkek	118		93,9	
Tutulum bölgesi	Nodal tutulum	115,1	0,915	95,9	0,498
	Ekstranodal tutulum	116,1		89,6	
Kemik İliği Tutulumu	Var	124,4	0,657	85,1	0,371
	Yok	113,1		96,7	
Hans Algoritması	ABC	116,1	0,897	91,3	0,559
	GCB	100,2		94,3	
CD10	Pozitif	96,7	0,496	95,5	0,504
	Negatif	117,1		91,6	
BCL2	Pozitif	108,3	0,118	86,5	0,127
	Negatif	122,4		96,9	
MUM1	Pozitif	110,9	0,968	92,9	0,938
	Negatif	115,9		91,8	
BCL6	Pozitif	111	0,928	95,1	0,332
	Negatif	115		83,6	
MYC	Pozitif	99,3	0,659	90,1	0,672
	Negatif	116,8		94,1	

Tablo 11: Tümörde FOXP3 ekspresyonu bulunan olguların sağkalım analizi

Sağkalım analizi	Tümörde FOXP3 ekspresyonu bulunan olgular		
Genel sağkalım analizi Medyan süre (ay)	Yaşayan hasta: 117,6	Exitus hasta: 111,3	p değeri 0,426
Progresyonsuz sağkalım analizi Medyan süre (ay)	Progresyonsuz hasta: 100,7 ay	Progresyonlu hasta: 98,2 ay	p değeri 0,589

Tablo 12: Tümörde PD-L1 ekspresyonu, tümör mikroçevresinde PD-L1, PD-1, FOXP3,CD4, CD8, CD68, CD163 ekspresyonu, Ki67 proliferasyon indeksi ile sağkalım arasındaki ilişki

İmmunhistokimyasal Belirteçler	Genel Sağkalım			Progresyonsuz Sağkalım		
	Yaşayan	Ex hasta	p	Progresyon yok	Progresyon var	p
Tümörde PD-L1 ekspresyon oranı (%)	8,4	2,2	0,211	7,1	6,0	0,723
Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı (%)	7,5	5,5	0,530	6,6	8,6	0,913
Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyon oranı (%)	16,0	11,3	0,358	14,9	14,4	0,677
Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyon oranı (%)	12,5	12,6	0,880	12,6	12,0	0,823
Tümör mikroçevresinde CD4 ekspresyon oranı (%)	47,8	42,4	0,302	48,1	38,8	0,068
Tümör mikroçevresinde CD8 ekspresyon oranı (%)	52,2	57,9	0,274	51,9	61,6	0,055
Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyon oranı (%)	33,0	29,6	0,625	33,0	28,0	0,254
Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre sayısı (n)	48,6	43,9	0,422	48,5	42,5	0,249
Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyon oranı (%)	32,9	29,2	0,753	33,0	27,1	0,208
Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı (n)	41,8	39,1	0,794	42,1	36,5	0,321
Ki67 proliferasyon indeksi (%)	66,6	71,0	0,189	68,6	63,6	0,813

Yukarıda belirtilen belirteçler ile sağkalım arasındaki ilişki "Cox" regresyon analizi ile değerlendirilmiş ve ortalama değerler hesaplanmıştır.

4.7 CD10, BCL6 ve MUM1 İmmunhistokimyasal İncelemeleri İle Hans Algoritması

İmmunhistokimyasal incelemelerde CD10 ile 42 (%25,8) olguda, BCL6 ile 124 (%76,1) olguda, MUM1 ile 96 (%58,9) olguda pozitiflik mevcuttu. CD10, BCL6 ve MUM1 immunhistokimyasal incelemelerinin sonuçları değerlendirilerek olgulara Hans algoritması uygulandı. Hans algoritmasına göre olguların 101 tanesi (%62) non-GCB/ABC alt tipinde, 62 tanesi (%38) GCB alt tipinde değerlendirildi. Ki67 proliferasyon indeksi ile Hans algoritması arasındaki ilişki değerlendirildi. Hans algoritmasına göre uyarlandığında non-GCB/ABC fenotipindeki grupta Ki67 proliferasyon indeksi medyan değeri %80, GCB fenotipindeki grupta %70 olarak hesaplandı ancak istatistiksel anlamlılık saptanmadı ($p=0,081$). Hans algoritması ile serum LDH düzeyleri karşılaştırıldığında non-GCB/ABC fenotipindeki grupta medyan değeri 428 U/L, GCB fenotipindeki grupta medyan değeri 359 U/L olarak belirlendi ancak istatistiksel anlamlılık bulunmadı ($p=0,050$).

Tablo 13: Olguların CD10, MUM1 ve BC6 ekspresyon durumu

İmmunhistokimyasal Belirteçler	Olgu Sayısı ve Oranları					
	Pozitif (n)	Pozitif (%)	Negatif (n)	Negatif (%)	Toplam (n)	Toplam (%)
CD10	42	25,8	121	74,2	163	100
MUM1	96	58,9	67	41,1	163	100
BCL6	124	76,1	39	23,9	163	100

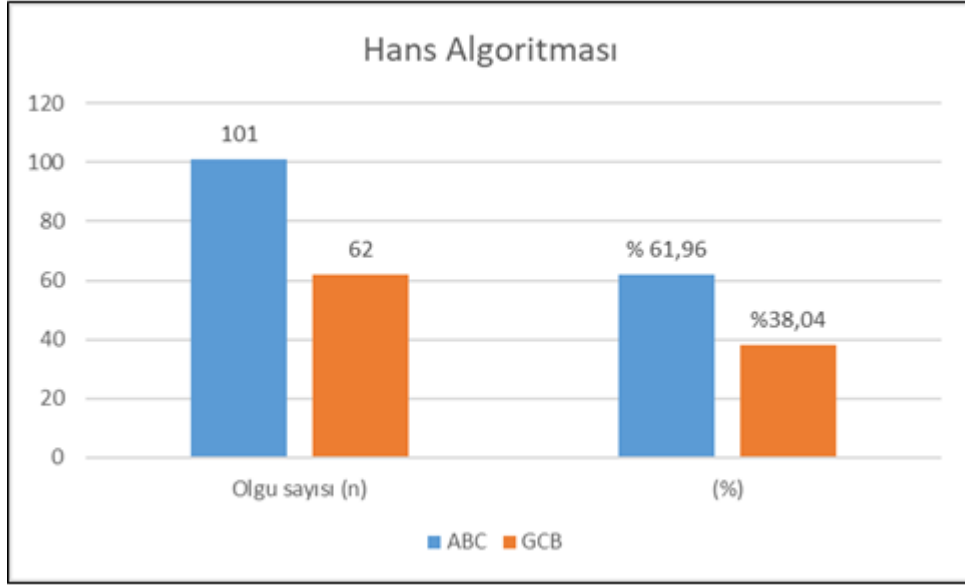
Tablo 14: Tanı yaşı, Ki67 proliferasyon indeksi, serum LDH düzeyi ile Hans algoritması ilişkisi

Klinik ve patolojik özellikler	Hans Algoritması		
	ABC	GCB	p değeri
Tanı yaşı (yıl)	60,5	58,3	0,157
Ki67 proliferasyon indeksi (% medyan değer)	80	70	0,081
Serum LDH düzeyi (medyan değer U/L)	428	359	0,050*

* $p=0,050095$

Tablo 15: Tümörde ve mikroçevrede PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68, CD163 ekspresyonu ile CD10, BCL6, MUM1, Hans Algoritması arasındaki ilişki

İmmunhistokimyasal Belirteçler	CD10			BCL6			MUM1			Hans Algoritması		
	Pozitif	Negatif	p	Pozitif	Negatif	p	Pozitif	Negatif	p	ABC	GCB	p
Tümörde PD-L1 ekspresyon oranı (%)	3,0	8,2	0,052	5,3	11,8	<u>0,025</u>	8,6	4,5	0,142	8,3	4,7	0,089
Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı (%)	14,0	4,5	<u><0,001</u>	7,5	5,2	0,189	4,4	10,7	<u><0,001</u>	3,8	12,2	<u><0,001</u>
Tümörde PD-1 ekspresyon oranı (%)	1,0	2,5	0,955	2,7	0,0	0,258	2,5	1,5	0,513	2,0	2,3	0,628
Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyon oranı (%)	25,7	11,1	<u><0,001</u>	15,6	12,6	0,232	10,8	20,6	<u>0,008</u>	11,3	20,7	<u>0,008</u>
Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyon oranı (%)	19,9	9,9	0,073	14,3	6,8	<u>0,022</u>	9,1	17,3	0,081	9,2	17,8	0,151
Tümör mikroçevresinde CD4 ekspresyon oranı (%)	47,0	46,2	0,900	47,0	44,6	0,661	44,9	48,7	0,376	47,6	44,6	0,402
Tümör mikroçevresinde CD8 ekspresyon oranı (%)	53,0	53,8	0,890	53,0	55,6	0,622	55,1	51,5	0,399	52,5	55,4	0,418
Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyon oranı (%)	30,5	32,7	0,558	30,9	36,1	0,220	34,2	29,2	0,110	32,9	30,9	0,447
Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre sayısı (n)	53,3	45,4	0,145	45,7	53,1	0,342	48,9	45,3	0,515	45,9	50,0	0,516
Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyon oranı (%)	26,8	33,7	<u>0,038</u>	30,4	36,8	0,108	36,5	25,3	<u>0,001</u>	33,9	28,8	0,065
Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı (n)	32,2	44,2	<u>0,009</u>	38,9	48,1	0,126	47,6	31,8	<u><0,001</u>	45,0	34,8	<u>0,010</u>
Tümörde FOXP3 ekspresyonu (olgu sayısı ve oranı)	n=5 %11,9	n=40 %33,1	<u>0,008</u>	n=34 %27,4	n=11 %28,2	0,924	n=37 %38,5	n=8 %11,9	<u><0,001</u>	n=36 %35,6	n=9 %20	<u>0,003</u>



Şekil 12: Olguların Hans Algoritmasına göre sayı ve oranı

4.8 BCL2 ve MYC İmmunhistokimyasal İncelemeleri

İmmunhistokimyasal yöntemle 163 olgunun 72'sinde (%44,2) BCL2 pozitifliği saptandı. BCL2 immunhistokimyasal inceleme sonuçları ile tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre oranı ve 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı karşılaştırıldı. BCL2 negatif saptanan olgularda pozitif olgulara kıyasla ile tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre oranının ve 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısının anlamlı olarak daha fazla olduğu gözlemlendi (sırasıyla $p=0,0032$, $p=0,032$). BCL2 immunhistokimyasal belirtecinin pozitif ya da negatif olması ile progresyonsuz sağkalım arasında anlamlılık bulunmadı ($p=0,497$).

İmmunhistokimyasal yöntemle 163 olgunun 72'sinde (%44,2) MYC pozitif saptandı. MYC immunhistokimyasal inceleme ile pozitif saptanan olgularda negatif olgulara göre tümör hücrelerinde PD-L1 boyanma şiddeti ve boyanma skorunun anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0,047$, $p=0,031$).

MYC immunhistokimyasal inceleme ile pozitif saptanan olgularda negatif olgulara kıyasla tümör mikroçevresinde PD-L1 pozitif hücre oranının anlamlı olarak daha düşük olduğu bulundu ($p=0,026$).

MYC immunhistokimyasal inceleme ile pozitif saptanan olgularda negatif olgulara kıyasla tümör mikroçevresinde FOXP3 pozitif hücre oranı anlamlı olarak daha yüksekti. ($p=0,004$).

MYC immunhistokimyasal inceleme ile pozitif saptanan olgularda negatif olgulara kıyasla tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre oranı anlamlı olarak daha düşüktü (p=0,035).

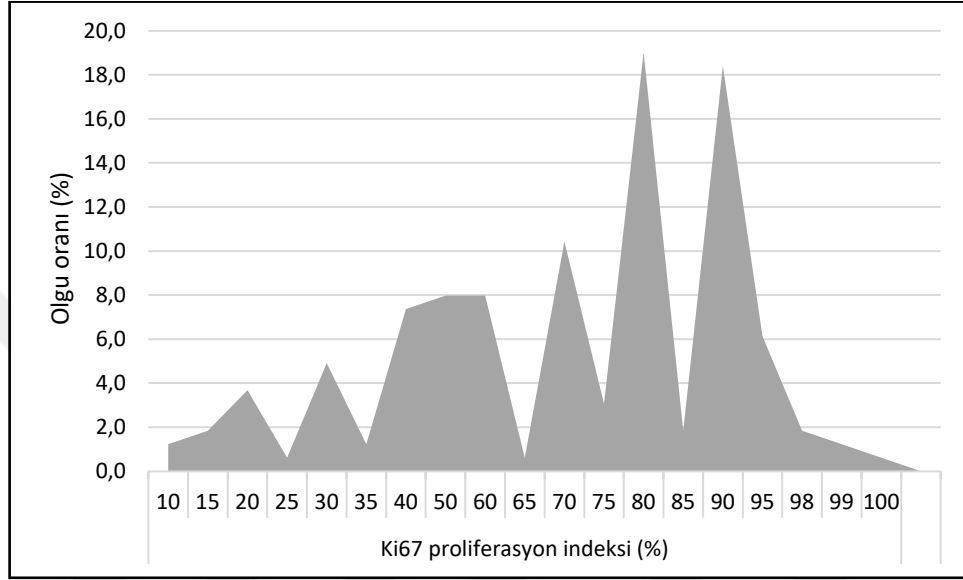
MYC immunhistokimyasal inceleme ile pozitif saptanan olgularda negatif olgulara kıyasla Ki67 proliferasyon indeksi anlamlı olarak daha yüksekti (p=0,002).

Tablo 16: Tümörde ve tümör mikroçevresinde PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8 CD68, CD163 ekspresyonu ile BCL2 ve MYC ekspresyonu arasındaki ilişki

İmmunhistokimyasal Belirteçler	BCL2			MYC		
	pozitif olgularda	negatif olgularda	p değeri	pozitif olgularda	negatif olgularda	p değeri
Tümörde PD-L1 ekspresyon oranı (%)	7,2	6,6	0,928	9,2	5,4	<u>0,028</u>
Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı (%)	5,3	8,3	0,497	5,0	8,2	<u>0,026</u>
Tümörde PD-1 ekspresyon oranı (%)	4,2	0,4	0,203	3,1	1,4	0,648
Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyon oranı (%)	9,5	19,1	0,063	11,2	17,2	0,173
Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyon oranı (%)	10,4	14,2	0,237	15,5	10,6	<u>0,004</u>
Tümör mikroçevresinde CD4 ekspresyon oranı (%)	43,8	48,6	0,268	47,1	46	0,771
Tümör mikroçevresinde CD8 ekspresyon oranı (%)	56,3	51,5	0,256	53,0	54,0	0,798
Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyon oranı (%)	56,3	52,2	<u>0,011</u>	33,7	31,1	0,448
Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre sayısı (n)	41,4	52,2	<u>0,032</u>	44,7	49,2	0,425
Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyon oranı (%)	30,1	33,4	0,357	36,4	29	<u>0,035</u>
Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı (n)	39,9	42,1	0,924	43,7	39,5	0,095
Tümörde FOXP3 ekspresyonu (olgu sayısı ve oranı)	n=32 %44,4	n=13 %14,3	<u>≤0,001</u>	n= 27 %42,2	n=18 %18,2	0,001

4.9 Ki67 Proliferasyon İndeksi

Çalışmaya dahil edilen tüm olguların değerlendirilmesi sonucunda Ki67 proliferasyon indeksi medyan değeri %75 olarak bulunmuş olup değerler %10 ile %100 arasında değişmekteydi. Ki67 proliferasyon indeksi ile genel sağkalım arasındaki ilişki değerlendirildi ancak anlamlılık saptanmadı ($p=0,189$).



Şekil 13: Olguların Ki67 proliferasyon indeksi dağılımı

Tablo 17: Tümörde ve tümör mikroçevresinde PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68, CD163 ekspresyonu ile Ki67 proliferasyon indeksi arasındaki ilişki

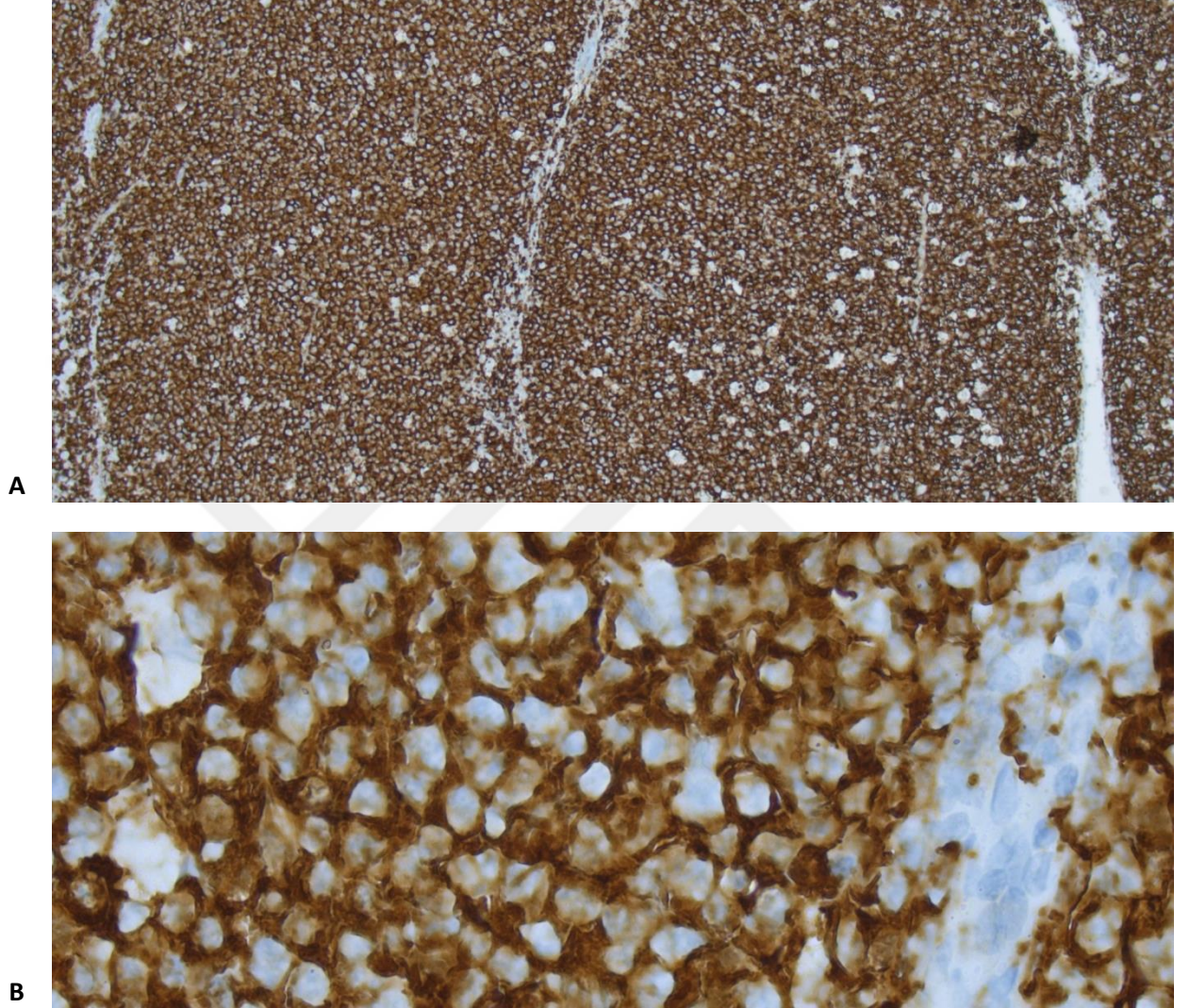
İmmünohistokimyasal Belirteçler	Ki67 Proliferasyon İndeksi (%)		
	p	r (korelasyon katsayısı)	İstatistiksel Anlamlı İlişki
Tümörde PD-L1 ekspresyon oranı (%)	<u>0,030</u>	<u>0,170</u>	Pozitif korelasyon
Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı (%)	0,088	-0,134	Anlamlı ilişki yok
Tümörde PD-1 ekspresyon oranı (%)	0,847	0,015	Anlamlı ilişki yok
Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyon oranı (%)	0,152	-0,113	Anlamlı ilişki yok
Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyon oranı (%)	0,820	-0,018	Anlamlı ilişki yok
Tümör mikroçevresinde CD4 ekspresyon oranı (%)	0,099	-0,130	Anlamlı ilişki yok
Tümör mikroçevresinde CD8 ekspresyon oranı (%)	0,090	0,133	Anlamlı ilişki yok
Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyon oranı (%)	<u>0,035</u>	<u>0,165</u>	Pozitif korelasyon
Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre sayısı (n)	0,227	0,095	Anlamlı ilişki yok
Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyon oranı (%)	<u><0,001</u>	<u>0,280</u>	Pozitif korelasyon
Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı (n)	<u>0,001</u>	<u>0,254</u>	Pozitif korelasyon

4.10 EBER-CISH Yöntemi ile EBV Değerlendirmesi

EBER-CISH yöntemi ile tüm olguların beşinde (%3,1) az sayıda tümör hücresinde EBV pozitifliği izlendi.

4.11 Tümörde PD-L1 İmmunhistokimyasal İncelemesi

Tümör hücrelerinde PD-L1 immünohistokimyasal değerlendirmesine ait veriler ile boyanma oranı, boyanma skoru ve boyanma şiddeti olarak belirlendi.



Resim 4: A. Tümörde PD-L1 ekspresyonu (DAB; 5x) B. Tümörde PD-L1 ekspresyonu (DAB; 40x)

Tablo 18: PD-L1 ekspresyonu gösteren olgu sayısı ve oranı

PD-L1 Ekspresyonu	Olgu sayısı (n)	Olgu oranı (%)	Toplam Olgu Sayısı (n)
Tümörde PD-L1 ekspresyonu	41	27,6	163
Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyonu	134	82,2	163

Çalışmamızda 41 olguda PD-L1 ile tümör hücrelerinde sitoplazmik ve/veya membranöz pozitiflik (%25,2) saptandı. Bu olgularda PD-L1 pozitif tümör hücrelerinin, tüm tümör hücrelerine oranı %1-%100 arasında değişmekte idi. Tümör hücrelerinde PD-L1 pozitifliği izlenen 41 olgunun 22'sinin (%53,7) kadın, 19'unun (%46,3) erkek olduğu belirlendi, ancak anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0,633$). PD-L1 ile tümör hücrelerinde boyanma oranı ile tanı yaşı arasındaki ilişki değerlendirildi, ancak anlamlılık bulunmadı ($p=0,240$). Olguların 29'unun (%70,7) nodal, 12'sinin (%29,3) ektranodal yerleşimli olduğu belirlendi. Nodal yerleşimli olgularda ektranodal yerleşimli olgulara kıyasla tümör hücrelerinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma oranı anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0,013$). Nodal yerleşimli olguların en sık 12 olgu (%29,3) ile baş-boyun bölgesinde bulunan lenf nodüllerinden alınan biyopsiler ile tanı aldığı saptandı. Yedi olgu (%17,1) inguinal lenf nodülü, altı olgu (%14,7) aksiller lenf nodülü, iki olgu (%4,9) supraklaviküler lenf nodülü yerleşimli idi. Ektranodal tutulum bölgeleri sıklık sırası ile dört olguda (%9,8) intraabdominal yumuşak doku, üç olguda (%7,3) tonsil, üç olguda (%7,3) testis, iki olguda (%4,9) gastrointestinal traktüs, bir olguda (%2,4) baş-boyun bölgesi yumuşak doku ve bir olguda (%2,4) kemik olarak değerlendirildi.

Genel sağkalım ve progresyon durumu açısından değerlendirildiğinde, PD-L1 ile tümör hücrelerinde sitoplazmik ve/veya membranöz pozitiflik bulunan 41 olgunun 12'sinin (%29,3) öldüğü belirlendi. Ancak tümör hücrelerinde PD-L1 sitoplazmik ve/veya membranöz boyanma oranı ile genel sağkalım süresi ve progresyonsuz sağkalım süresi arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p=0,211$, $p=0,129$).

PD-L1 sitoplazmik ve/veya membranöz pozitifliği bulunan 41 olgunun 32'sinin (%78) arşivimizde evreleme amacıyla yapılmış kemik iliği biyopsisi mevcut olup yedisinin (%17,1) kemik iliğinde DBBHL infiltrasyonu saptandı, ancak anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0,416$). Olgular CD10 ve MUM1 immunhistokimyasal inceleme sonuçları açısından değerlendirildiğinde altı olguda (%14,7) CD10 pozitifliği, 28 olguda (%68,3) MUM1 pozitifliği saptandı, ancak anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0,052$, $p=0,142$). İmmunhistokimyasal yöntemle 41 olgunun 26'sında (%63,4) BCL6 pozitifliği belirlendi. BCL6 pozitif olgularda tümör hücresinde PD-L1 boyanma oranı BCL6 negatif gruba kıyasla anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p=0,025$). Bu bulgular Hans algoritmasına uyarlandığında olguların 30'unun (%73,2) non-GCB/ABC alt grubunda, 11'inin (%26,8) ise GCB alt grubunda yer aldığı belirlendi, ancak anlamlı ilişki bulunmadı ($p=0,089$). İmmunhistokimyasal yöntemle MYC ile 22 olguda (%53,7) pozitiflik izlenmiş olup bu olgularda MYC negatif olgulara kıyasla tümör

hücrelerinde PD-L1 boyanma oranının anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlendi ($p=0,028$). İmmunhistokimyasal yöntemle BCL2, tümör hücrelerinde PD-L1 pozitifliği saptanan 18 olguda (%44) pozitif bulundu ancak anlamlı ilişki bulunmadı ($p=0,928$). Tümör hücrelerinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma oranı tanı döneminde ölçülen serum LDH düzeyi arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0,125$).

Tümör hücrelerinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma oranı ve skoru ile tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerde PD-1 boyanma oranı arasında anlamlı ilişki bulunmadı (sırasıyla $p=0,639$, $p=0,658$).

Tümör hücrelerinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma oranı ile CD68 immünohistokimyasal incelemesine ait veriler karşılaştırıldı. Tümör hücrelerinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma oranı ile 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı ve CD68 pozitif hücrelerin mikroçevreyi oluşturan hücrelere oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon bulundu ($p<0,001$, $p<0,001$).

Tümör hücrelerinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma oranı ile CD163 immünohistokimyasal incelemesine ait veriler karşılaştırıldı. Tümör hücrelerinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma oranı ile 1 BBA'da CD163 pozitif hücre sayısı ve CD163 pozitif hücrelerin mikroçevreyi oluşturan hücrelere oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon bulundu ($p<0,001$, $p<0,001$).

Tümör hücrelerinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma oranı ile Ki67 proliferasyon indeksi arasında pozitif korelasyon mevcuttu ($p=0,030$).

Tümör hücrelerinde izlenen sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma oranlarına göre beş grupta değerlendirilerek boyanma oranı %1-5: skor 1, %6-9: skor 2, %10-25: skor 3, %26-50: skor 4, %51-100: skor 5 şeklinde skorlandı. Tümör hücrelerinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma bulunmayan 122 olgu (%74,8) skor 0 olarak gruplandırıldı. Tümör hücrelerinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 pozitifliği bulunan 41 olgu arasında dokuz olgu (%5,5) skor 1, 11 olgu (%6,7) skor 2, yedi olgu (%4,3) skor 3, beş olgu (%3,1) skor 4, dokuz olgu (%5,5) skor 5 olarak değerlendirildi.

Tümör hücrelerinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma skoru ile CD68 immünohistokimyasal incelemesine ait veriler karşılaştırıldı. Tümör hücrelerinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma skoru ile 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı ve CD68 pozitif hücrelerin mikroçevreyi oluşturan hücrelere oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon bulundu ($p<0,001$, $p<0,001$).

Tümör hücresinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 skoru ile CD163 immunhistokimyasal incelemesine ait veriler karşılaştırıldı. Tümör hücresinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma skoru ile 1 BBA’da CD163 pozitif hücre sayısı ve CD163 pozitif hücrelerin mikroçevreyi oluşturan hücrelere oranı arasında istatistiksel olarak pozitif korelasyon bulundu ($p<0,001$, $p<0,001$).

Tablo 19: Tümörde ve Tümör Mikroçevresinde PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68 CD163 ekspresyonu; Tümör Mikroçevresinde PD-L1 Ekspresyonu ile Tümörde PD-L1 Ekspresyonu Arasındaki İlişki

İmmunhistokimyasal Belirteçler	Tümörde PD-L1 Ekspresyonu		
	r	p	İstatistiksel Anlamlı İlişki
Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı	0,145	0,065	saptanmadı
Tümörde PD-1 ekspresyon oranı	0,012	0,875	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyon oranı	-0,037	0,639	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyon oranı	0,095	0,230	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD4 ekspresyon oranı	0,011	0,889	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD8 ekspresyon oranı	-0,013	0,867	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyon oranı	<u>0,371</u>	<u><0,001</u>	Pozitif korelasyon
Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre sayısı	<u>0,333</u>	<u><0,001</u>	Pozitif korelasyon
Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyon oranı	<u>0,447</u>	<u><0,001</u>	Pozitif korelasyon
Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı	<u>0,419</u>	<u><0,001</u>	Pozitif korelasyon

Tümör hücresinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma oranı nodal tutulum bulunan olgularda ekstranodal tutulum bulunanlara kıyasla anlamlı olarak daha yüksekti ($p=0,001$).

Tümör hücresinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma skoru ile Ki67 proliferasyon indeksi arasında pozitif korelasyon mevcuttu ($p=0,029$).

PD-L1 tümör hücrelerindeki boyanma şiddeti “0/1/2/3” şeklinde değerlendirildi. Tümör hücrelerinde PD-L1 pozitifliği saptanan toplam 41 olgu mevcuttu. Olguların 122’sinde

(%74,8) PD-L1 ile boyanma izlenmemiş olup boyanma şiddeti 0 olarak değerlendirildi. Tümör hücrelerindeki PD-L1 boyanma yoğunluğuna göre olguların 13'ünde (%8) boyanma şiddeti 1, 20'sinde (%12,3) boyanma şiddeti 2, sekizinde (%4,9) boyanma şiddeti 3 şeklinde saptandı. PD-L1 tümör hücrelerindeki boyanma şiddeti ile tümör hücresinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma skoru yanı sıra tümör hücresinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki bulundu (sırası ile $p<0,001$, $p<0,001$).

PD-L1 tümör hücrelerindeki boyanma şiddeti ile tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerde PD-L1 boyanma oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki saptandı ($p=0,035$).

PD-L1 tümör hücrelerindeki boyanma şiddeti ile tümör mikroçevresinde CD68 immunhistokimyasal incelemesine ait veriler karşılaştırıldı. Tümör hücresinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma şiddeti ile tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı ve CD68 pozitif hücrelerin mikroçevreyi oluşturan hücelere oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon bulundu ($p<0,001$, $p<0,001$).

PD-L1 tümör hücrelerindeki boyanma şiddeti ile tümör mikroçevresinde CD163 immunhistokimyasal incelemesine ait veriler karşılaştırıldı. Tümör hücresinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma şiddeti ile 1 BBA'da tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı ve CD163 pozitif hücrelerin mikroçevreyi oluşturan hücelere oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon bulundu ($p<0,001$, $p<0,001$).

PD-L1 tümör hücrelerindeki boyanma şiddeti ile Ki67 proliferasyon indeksi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamakla birlikte tümör hücrelerin PD-L1 boyanma şiddetinin arttığı olgularda Ki67 proliferasyon indeksinin de artış gösterdiği belirlendi ($p=0,063$).

4.12 Tümör Mikroçevresinde PD-L1 İmmunhistokimyasal İncelemesi

PD-L1 immunhistokimyasal yöntemle tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerde değerlendirildi. Olguların 57'sinde (%35) tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerde PD-L1 pozitifliği mevcuttu. Tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerde PD-L1 boyanma oranı %1 ile %70 arasında değişmekte olup ortalama %6,9 olarak bulundu. Tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerde PD-L1 boyanma oranı ile tanı yaşı değerlendirildiğinde anlamlılık bulunmadı ($p=0,465$).

Tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerde PD-L1 boyanma oranı ile tümör mikroçevresinde PD-1 pozitif hücre oranı ve skoru karşılaştırıldığında pozitif yönde anlamlı ilişki bulundu (sırasıyla $r=0,354$, $p<0,001$; $r=0,391$, $p<0,001$).

Tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerde PD-L1 boyanma oranı ile tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı arasında pozitif yönde anlamlı ilişki belirlendi ($p<0,001$).

Tablo 20: Tümörde ve tümör mikroçevresinde PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD68 CD163 ekspresyonu; Tümörde PD-L1 ekspresyonu ile tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki

İmmünohistokimyasal Belirteçler	Tümör Mikroçevresinde PD-L1 Ekspresyonu		
	p	r	İstatistiksel Anlamlı İlişki
Tümörde PD-L1 ekspresyon oranı	0,065	0,145	saptanmadı
Tümörde PD-1 ekspresyon oranı	0,617	-0,039	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyon oranı	<u><0,001</u>	<u>0,354</u>	Pozitif korelasyon
Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyon oranı	0,060	0,148	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD4 ekspresyon oranı	0,432	-0,062	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD8 ekspresyon oranı	0,401	0,066	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyon oranı	0,185	0,104	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre sayısı	<u><0,001</u>	<u>0,331</u>	Pozitif korelasyon
Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyon oranı	0,347	0,074	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı	0,652	0,036	saptanmadı

Tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerde PD-L1 boyanma oranı nodal tutulum bulunan olgularda ekstranodal tutulum bulunan olgulara göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı ($p=0,013$).

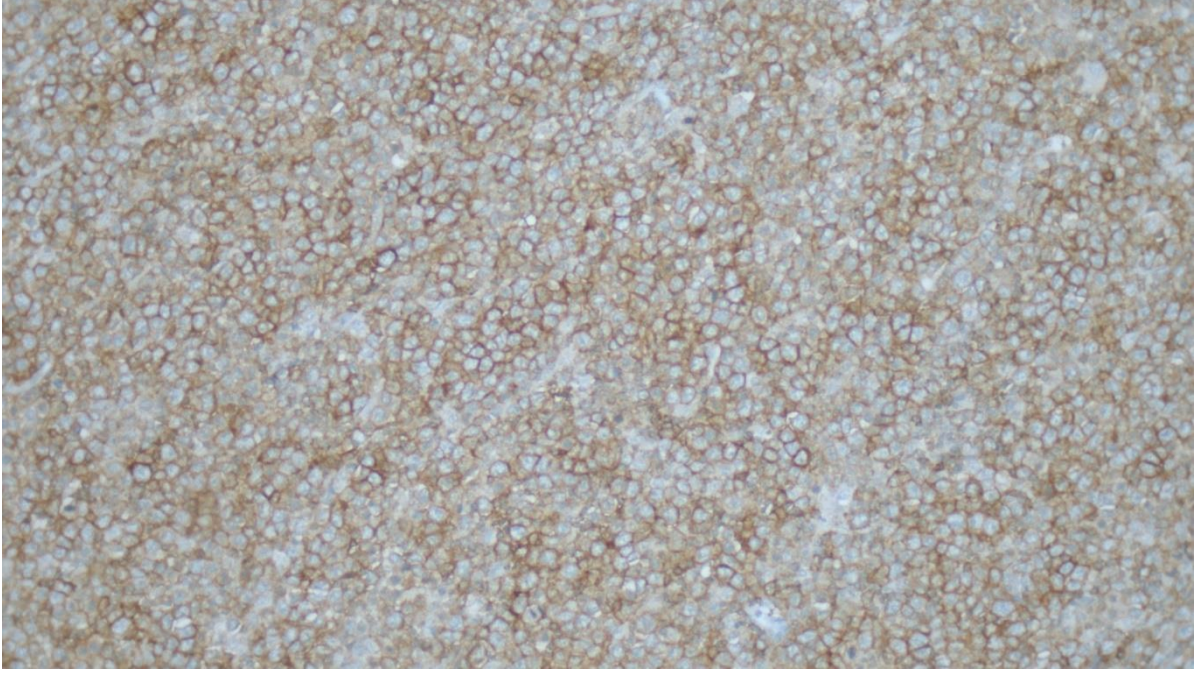
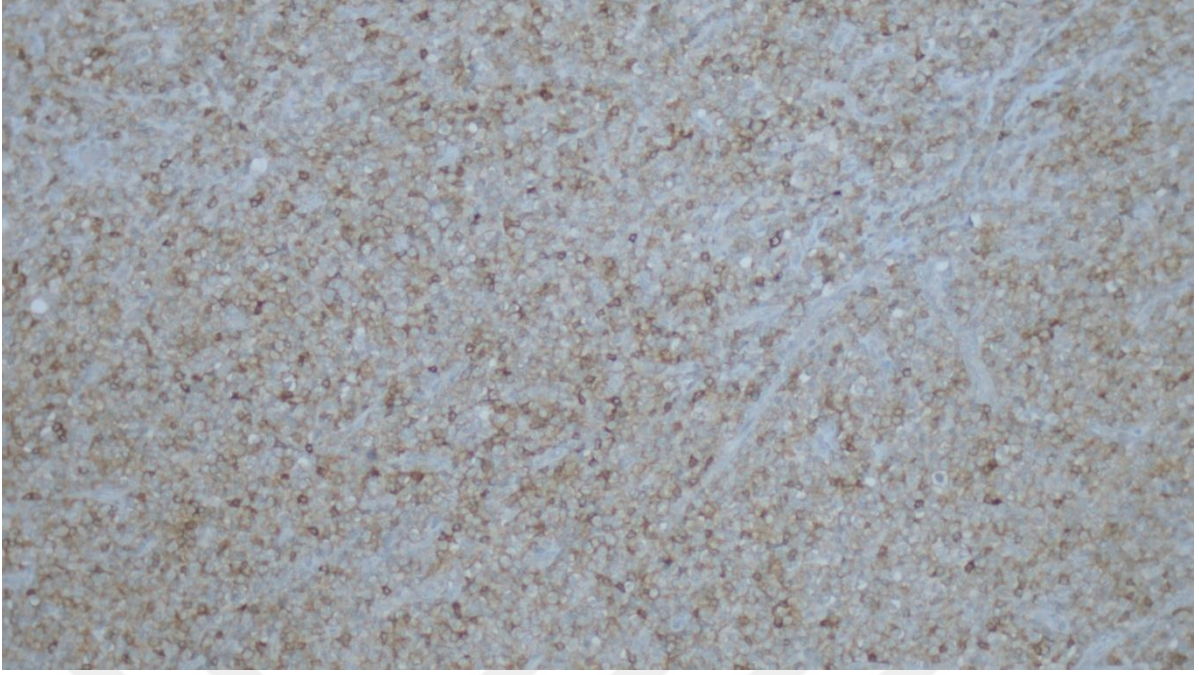
Tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerde PD-L1 boyanma oranı CD10 pozitif olgularda, CD10 negatif olgulara kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0,001$). Tümör mikroçevresinde PD-L1 boyanma oranının MUM1 negatif saptanan olgularda, MUM1 pozitif olgulara kıyasla anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlendi ($p<0,001$). Tümör mikroçevresinde PD-L1 boyanma oranı ile BCL6 immunhistokimyasal incelemesi arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p=0.189$).

Tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerde PD-L1 boyanma oranı ile Hans algoritması arasındaki ilişki değerlendirildiğinde GCB alt tipinde izlenen PD-L1 boyanma oranı, non-GCB/ABC alt tipine göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0,001$).

Tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerde PD-L1 boyanma oranı ile tanı yaşı, cinsiyet, serum LDH düzeyi, kemik iliği tutulumu, genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım arasında anlamlı ilişki bulunmadı (sırasıyla $p=0,065$, $p=0,066$, $p=0,216$, $p=0,836$, $p=0,530$, $p=0,676$).

4.13 Tümörde PD-1 immunhistokimyasal incelemesi

Tümör hücrelerinde PD-1 immunhistokimyasal incelemesinde dört olguda (%2,4) pozitiflik saptandı. Olguların üçünde (%1,8) tümör hücrelerinde PD-1 boyanma oranı %100, birinde (%0,6) PD-1 boyanma oranı %40 olarak değerlendirildi.



Resim 5: Lenf nodunda iki olguda tümörde PD-1 ekspresyonu (DAB;10x)

Tablo 21: PD-1 ekspresyonu gösteren olgu sayısı ve oranı

PD-1 Ekspresyonu	Olgu sayısı (n)	Olgu oranı (%)	Toplam Olgu Sayısı (n)
Tümörde PD-1 ekspresyonu	4	2,4	163
Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyonu	108	66,3	163

Tümör hücrelerinde PD-1 boyanma oranı ile tümör mikroçevresinde FOXP3 pozitif T hücre oranı arasında pozitif yönde anlamlı ilişki saptandı ($p=0,43$).

Tümör hücrelerinde PD-1 boyanma oranı ile tümörde PD-L1 immunhistokimyasal değerlendirmesine ait veriler arasında anlamlılık saptanmadı (sırasıyla $p= 0,875$, $p=0,995$, $p=0,848$). Tümör mikroçevresinde PD-L1 boyanma oranı ile tümör hücrelerinde PD-1 boyanma oranı arasındaki ilişki anlamsız bulundu ($p=0,617$).

Tümör hücrelerinde PD-1 boyanma oranı ile tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre sayısı ve CD68 pozitif hücre oranı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (sırasıyla $p= 0,260$, $p=0,059$).

Tümör hücrelerinde PD-1 boyanma oranı ile tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı ve CD163 pozitif hücre oranı arasındaki ilişki değerlendirildi ancak anlamlı bulunmadı (sırasıyla $p= 0,144$, $p=0,139$).

Tümör hücrelerinde PD-1 boyanma oranı ile tümör mikroçevresinde CD4 ve CD8 pozitif T hücrelerin oranı arasında korelasyon saptanmadı (sırasıyla $p= 0,776$, $p=0,768$).

Tablo 22: Tümörde ve tümör mikroçevresinde PD-L1, FOXP3, CD4, CD8, CD68 CD163 ekspresyonu; tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyonu ile tümörde PD-1 ekspresyonu arasındaki ilişki

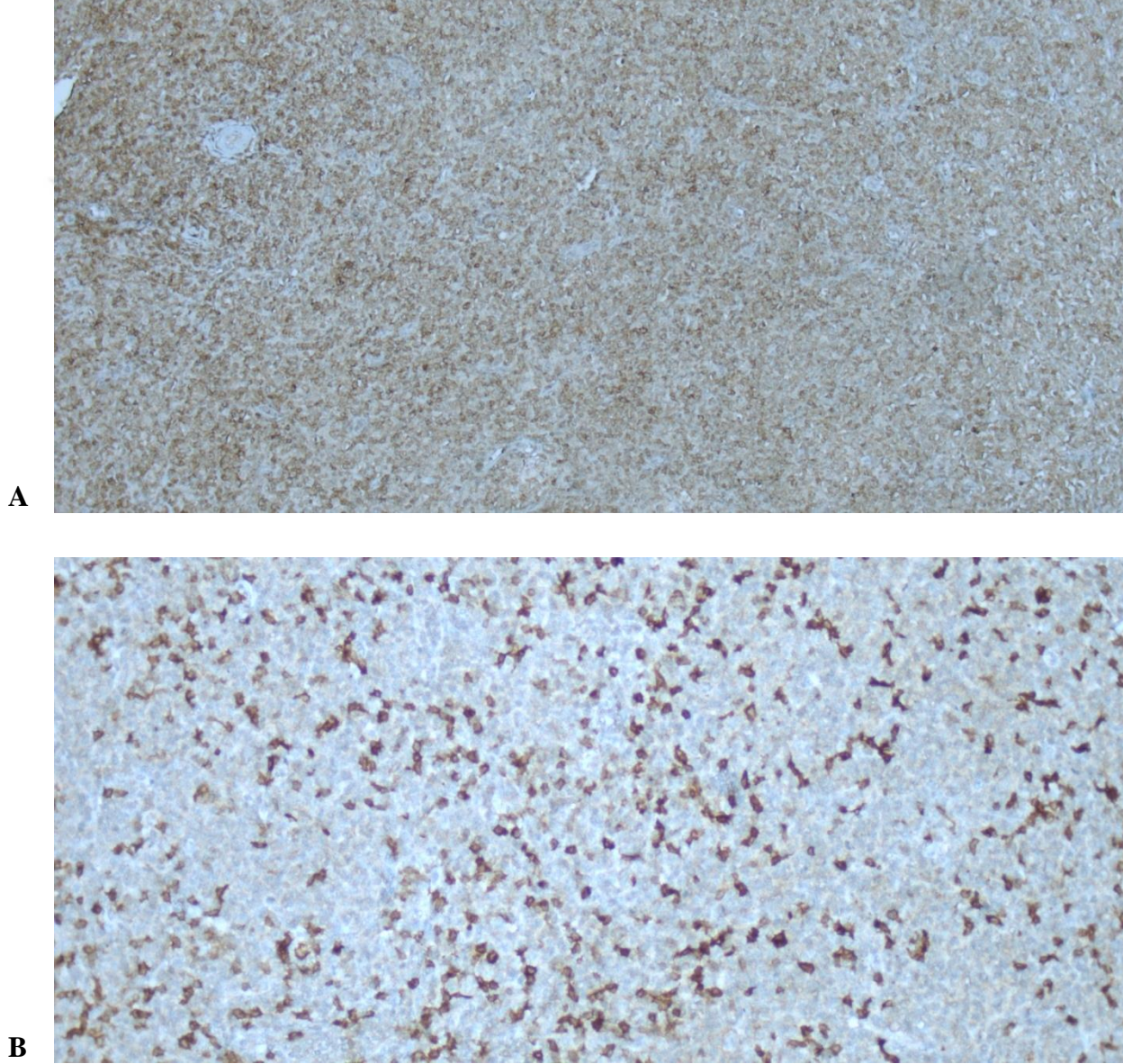
İmmunhitokimyasal Belirteçler	Tümörde PD-1 Ekspresyonu		
	p	r	İstatistiksel Anlamlı İlişki
Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı	0,875	0,012	saptanmadı
Tümörde PD-1 ekspresyon oranı	0,617	-0,039	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyon oranı	0,160	0,111	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyon oranı	<u>0,043</u>	<u>0,159</u>	Pozitif korelasyon
Tümör mikroçevresinde CD4 ekspresyon oranı	0,776	0,022	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD8 ekspresyon oranı	0,768	-0,023	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyon oranı	0,059	0,148	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre sayısı	0,260	0,089	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyon oranı	0,139	0,117	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı	0,144	0,115	saptanmadı

Tümör hücrelerinde PD-1 boyanma oranı ile tanı yaşı arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p=0,354$).

Tümör hücrelerinde PD-1 boyanma oranındaki artışın progresyon oranı açısından 0,359 kat artan riske sahip olduğu belirlendi (GA: 0,341-0,378) ($p<0,001$).

4.14 Tumor Mikroçevresinde PD-1 İmmunhistokimyasal İncelemesi

Tumor mikroçevresinde immunhistokimyasal yöntemle PD-1 pozitif hücre oranı araştırıldı. Olguların 108 tanesinde (%66,3) tumor mikroçevresinde PD-1 pozitif hücre saptandı. Bu olgularda tumor mikroçevresinde PD-1 pozitif hücrelerin tüm mikroçevreyi oluşturan hücelere oranı %1 ile %90 arasında değişmekte olup ortalama %14,85 olarak belirlendi.



Resim 6: A. Tumor mikroçevresinde PD-1 ekspresyonu (DAB; 2,5x), B. Tumor mikroçevresinde PD-1 ekspresyonu (DAB; 10x)

Tümör mikroçevresinde PD-1 pozitif hücrelerin tüm mikroçevreyi oluşturan hücelere oranlarına göre gruplanarak %1-5:skor 1, %6-9: skor 2, %10-25:skor 3, %26-50:skor 4, %51-100: skor 5 olarak belirlendi ve tümör mikroçevresinde PD-1 skoru olarak değerlendirildi.

Tümör mikroçevresinde PD-1 pozitif hücrelerin tüm mikroçevreyi oluşturan hücelere oranı ve skoru ile tümör mikroçevresinde FOXP3 pozitif T hücre oranı arasında pozitif korelasyon bulundu (sırasıyla $p<0,001$, $r=0,402$; $p<0,001$, $r=0,386$).

Tümör mikroçevresinde PD-1 pozitif hücrelerin tüm mikroçevreyi oluşturan hücelere oranı ile tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı ($p=0,016$, $r=0,189$). Tümör mikroçevresinde PD-1 skoru ile tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0,005$).

Tümör mikroçevresinde PD-1 skoru ve tümör mikroçevresinde CD4 pozitif T hücre oranı arasında pozitif korelasyon bulundu ($p=0,018$, $r=0,184$). Tümör mikroçevresinde PD-1 skoru ve tümör mikroçevresinde CD8 pozitif T hücre oranı arasında negatif korelasyon bulundu ($p=0,018$, $r=0,185$).

Tümör mikroçevresinde PD-1 pozitif hücrelerin tüm mikroçevreyi oluşturan hücelere oranı ile tümör mikroçevresinde CD4 pozitif T hücre oranı ve CD8 pozitif hücre oranı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (sırasıyla $p=0,009$, $p=0,009$).

Tablo 23: Tümörde ve tümör mikroçevresinde PD-L1, FOXP3, CD4, CD8, CD68 CD163 ekspresyonu; tümörde PD-1 ekspresyonu ile tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyonu arasındaki ilişki

İmmunhistokimyasal Belirteçler	Tümör Mikroçevresinde PD-1 Ekspresyonu		
	p	r	İstatistiksel Anlamlı İlişki
Tümörde PD-L1 ekspresyon oranı	0,639	-0,037	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı	<u>≤0,001</u>	<u>0,354</u>	Pozitif korelasyon
Tümörde PD-1 ekspresyon oranı	0,160	0,111	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyon oranı	<u>≤0,001</u>	<u>0,402</u>	Pozitif korelasyon
Tümör mikroçevresinde CD4 ekspresyon oranı	0,009	0,204**	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD8 ekspresyon oranı	0,009	-0,205	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyon oranı	0,222	0,096	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre sayısı	<u>0,016</u>	<u>0,189</u>	Pozitif korelasyon
Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyon oranı	0,806	-0,019	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı	0,834	-0,017	saptanmadı

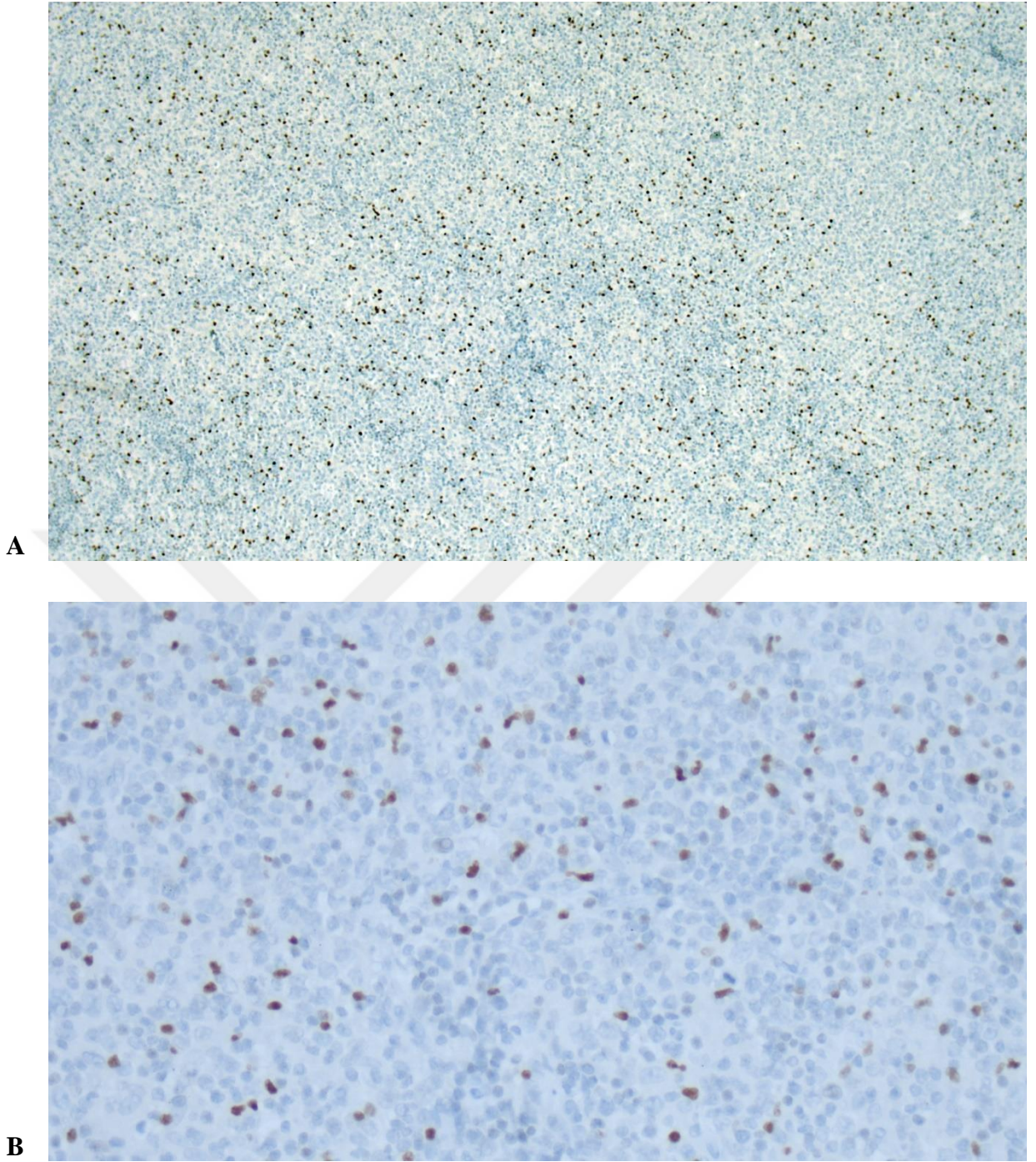
Tümör mikroçevresinde PD-1 pozitif hücrelerin tüm mikroçevreyi oluşturan hücrelere oranı ile genel sağkalım oranı ve progresyonsuz sağkalım oranı arasında anlamlı ilişki bulunmadı (sırasıyla p=0,358, p=0,786).

4.15 Tümör Mikroçevresinde FOXP3 İmmunhistokimyasal İncelemesi

FOXP3 immunhistokimyasal belirteci ile tümör mikroçevresinde nükleer ekspresyon gösteren T hücrelerin tüm mikroçevreyi oluşturan hücelere oranı değerlendirildi. Olguların 134'ünde (%82,2) tümör mikroçevresinde T hücrelerde FOXP3 pozitifliği izlendi. Bu olgularda FOXP3 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresine oranı %1 ile %85 arasında değişmekte olup ortalama %12,5 olarak saptandı.

Tablo 24: FOXP3 ekspresyonu gösteren olgu sayısı ve oranı

FOXP3 Ekspresyonu	Olgu sayısı (n)	Olgu oranı (%)	Toplam Olgu sayısı (n)
Tümörde FOXP3 ekspresyonu	45	27,6	163
Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyonu	134	82,2	163



Resim 7: A. Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyonu (DAB;5x), B. . Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyonu (DAB;20x)

FOXP3 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresine oranı ile tümörde PD-L1 immunhistokimyasal değerlendirmelerine ait veriler arasında anlamlı ilişki saptanmadı (sırasıyla $p=0,230$, $p=0,198$, $p=0,60$). FOXP3 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresine oranı

ile tümör mikroçevresinde CD4 pozitif T hücre oranı ve CD8 pozitif T hücre oranı arasındaki ilişki anlamlı bulunmadı (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,004$).

FOXP3 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresine oranı ile tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı ve CD68 pozitif hücrelerin mikroçevreyi oluşturan hücelere oranı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (sırasıyla $p=0,531$, $p=0,772$).

FOXP3 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresine oranı ile tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD163 pozitif hücre sayısı ve CD163 pozitif hücrelerin mikroçevreyi oluşturan hücelere oranı arasında anlamlı ilişki bulunmadı (sırasıyla $p=0,068$, $p=0,064$).

Tablo 25: Tümörde ve tümör mikroçevresinde PD-L1, PD-1, CD4, CD8, CD68 CD163 ekspresyonu ile tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyonu arasındaki ilişki

İmmunhistokimyasal Belirteçler	Tümör Mikroçevresinde FOXP3 Ekspresyonu		
	p	r	İstatistiksel Anlamlı İlişki
Tümörde PD-L1 ekspresyon oranı	0,230	0,095	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı	0,060	0,148	saptanmadı
Tümörde PD-1 ekspresyon oranı	<u>0,043</u>	<u>0,159</u>	pozitif korelasyon
Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyon oranı	<0,001	0,402	pozitif korelasyon
Tümör mikroçevresinde CD4 ekspresyon oranı	0,004	0,222 **	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD8 ekspresyon oranı	0,004	-0,223**	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyon oranı	0,772	0,023	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre sayısı	0,531	0,049	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyon oranı	0,064	-0,145	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı	0,068	-0,143	saptanmadı

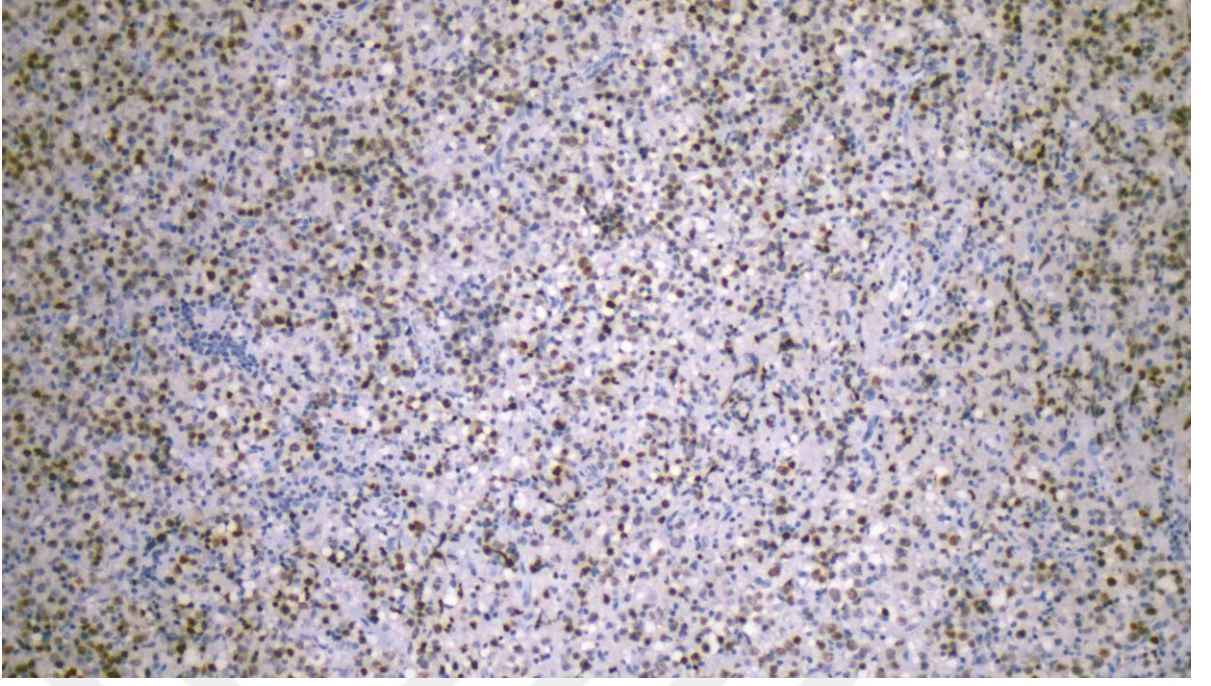
FOXP3 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresine oranı ile tanı yaşı ve tanı döneminde ölçülen serum LDH düzeyi arasındaki ilişki anlamlı saptanmadı (sırasıyla $p=0,959$, $p=0,350$).

FOXP3 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresine oranı ile genel sağkalım süresi ve progresyonsuz sağkalım süresi arasında anlamlı ilişki bulunmadı (sırasıyla $p=0,823$, $p=0,990$).

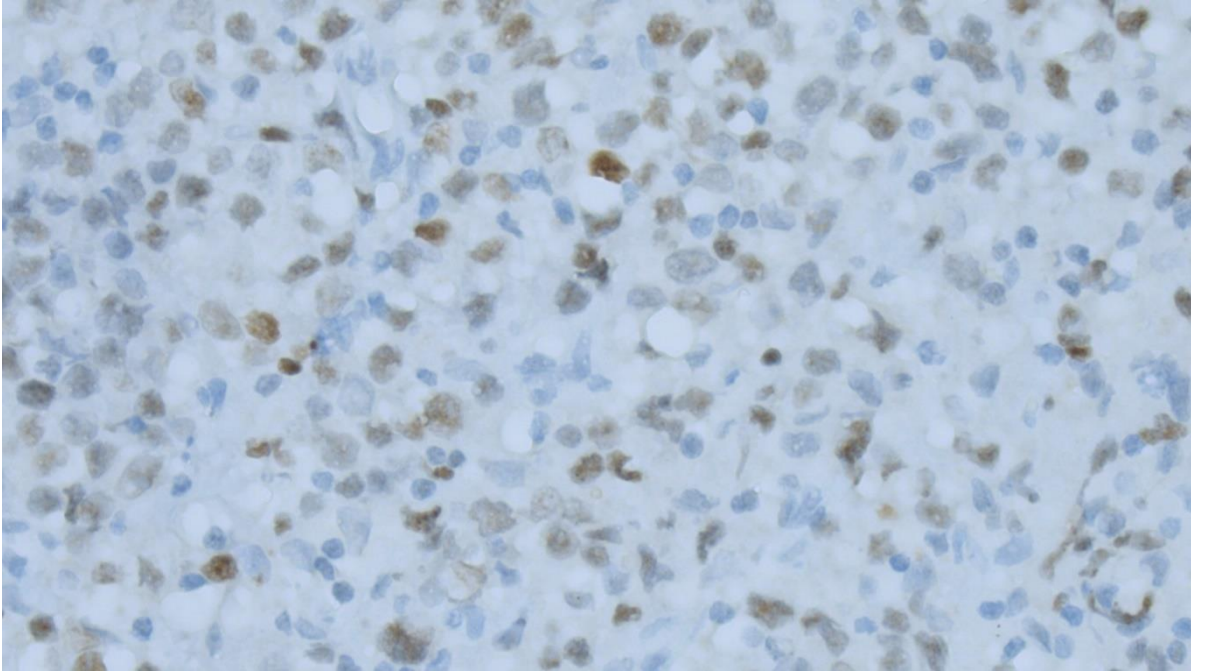
4.16 Tümörde FOXP3 İmmunhistokimyasal İncelemesi

İmmunhistokimyasal yöntemle tümör hücrelerinde FOXP3 pozitif ve negatif olgular şeklinde değerlendirildiğinde tüm olguların 45'inde (%27,6) pozitiflik saptandı.





A



B

Resim 8: **A.** Tümörde FOXP3 ekspresyonu (DAB; 5x), **B.** Tümörde FOXP3 ekspresyonu (DAB; 40x)

Tümörde FOXP3 pozitif saptanan olgularda Ki67 proliferasyon indeksi anlamlı olarak daha yüksekti ($p=0,020$).

Tümörde FOXP3 pozitif saptanan olgularda serum LDH düzeyi anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0,001$).

Tümörde FOXP3 ekspresyonu ile CD10 ekspresyonu arasında negatif yönde anlamlı ilişki saptandı ($p=0,008$).

Tümörde FOXP3 ekspresyonu ile MUM1 ekspresyonu arasında pozitif yönde anlamlı ilişki saptandı ($p<0,001$).



Tablo 26: Tümörde ve tümör mikroçevresinde PD-L1, PD-1, CD4, CD8 CD68 CD163 ekspresyonu; tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyonu ile tümörde FOXP3 ekspresyonu arasındaki ilişki

İmmünohistokimyasal Belirteç	Tümörde FOXP3 Ekspresyonu		
	Pozitif	Negatif	p
Tümörde PD-L1 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	10,1	5,7	0,138
Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	6,6	7,1	0,572
Tümörde PD-1 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	2,2	2,0	0,912
Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	8,9	17,1	0,197
Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	10,4	13,3	0,440
Tümör mikroçevresinde CD4 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	40,3	48,8	0,069
Tümör mikroçevresinde CD8 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	59,7	51,3	0,073
Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	29,5	33,1	0,420
Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre sayısı (n=ortalama değer)	43,3	49,0	0,256
Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyon oranı (% ortalama değer)	30,5	32,5	0,847
Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı (n=ortalama değer)	40,1	41,5	0,850

Tümörde FOXP3 ekspresyonu bulunan olgular Hans algoritmasına uyarlandığında, olguların daha yüksek oranda non-GCB/ABC, daha düşük oranda GCB fenotipinde olduğu saptandı. Bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,003$).

Tümörde FOXP3 pozitif saptanan olgularda tümör mikroçevresinde CD4 pozitif hücre oranı daha düşük, CD8 pozitif hücre oranı daha yüksek bulundu ancak bu ilişki istatistiksel olarak anlamsızdı (sırasıyla $p=0,069$, $p=0,073$).

Tümörde FOXP3 ekspresyonu ile progresyonsuz sağkalım arasındaki ilişki değerlendirildi ancak anlamlı bulunmadı ($p=0,783$).

4.17 Tümör Mikroçevresinde CD4 ve CD8 İmmunhistokimyasal İncelemesi

İmmunhistokimyasal yöntemle CD4 ve CD8 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresindeki T hücrelere oranı değerlendirildi. CD4 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresindeki T hücrelere oranı %5 ile %90 arasında değişen düzeyde saptanmış olup ortalama değeri %45 olarak belirlendi. CD8 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresindeki T hücrelere oranı %10 ile %95 arasında değişen düzeyde saptanmış olup ortalama değeri %55 olarak bulundu. Olguların 82'sinde (%50,3) CD8 pozitif hücre oranı CD4 pozitif hücre oranından daha fazla bulunmuş olup 71 olguda (%43,6) CD4 pozitif hücre oranı CD8 pozitif hücre oranından daha fazla olarak belirlenmiştir. Olguların onunda (%6,1) CD4 ve CD8 pozitif hücre oranları benzer olarak saptanmıştır. CD4 ve CD8 pozitif hücre oranlarının genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım açısından ilişkisi değerlendirilmiş ancak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p=0,276$, $p=0,233$). CD4 ve CD8 pozitif hücre oranlarının kemik iliği tutulumu ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamsızdır ($p=0,276$, $p=0,233$). CD4 pozitif hücre oranının daha fazla olduğu olguların beşinde, CD8 pozitif hücrelerin daha fazla olduğu grupta ise 14 olguda kemik iliği tutulumu saptanmış ancak anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p=0,100$).

Tablo 27: Tümör mikroçevresinde CD4 ve CD8 pozitif hücre oranı

CD4 ve CD8 ekspresyonu	Minimum Değer (%)	Maksimum Değer (%)	Ortalama Değer (%)
Tümör mikroçevresinde CD4 pozitif hücre oranı	5	90	45
Tümör mikroçevresinde CD8 pozitif hücre oranı	10	95	55

CD4 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresindeki T hücrelere oranı ile tümör hücresinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma oranı, boyanma skoru ve

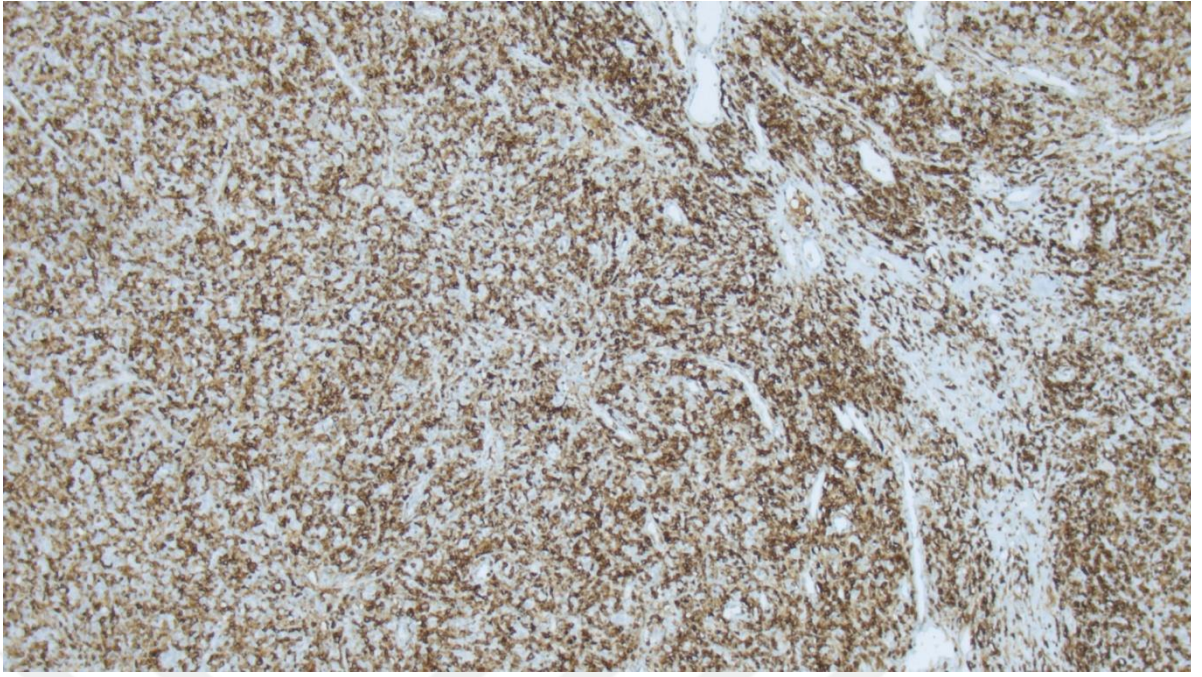
boyanma şiddeti arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı (sırasıyla $p=0,889$, $p=0,910$, $p=0,977$). CD4 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresindeki T hücelere oranı ile tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmadı ($p=0,432$). CD4 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresindeki T hücelere oranı ile tümör mikroçevresinde ve tümör hücrelerinde PD-1 boyanma oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon gözlenmedi (sırasıyla $p=0,009$, $p=0,776$). CD4 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresindeki T hücelere oranı ile tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı ve CD68 pozitif hücre oranı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamsızdı (sırasıyla $p=0,673$, $p=0,252$). CD4 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresindeki T hücelere oranı ile tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD163 pozitif hücre sayısı ve CD163 pozitif hücre oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı (sırasıyla $p=0,763$, $p=0,464$).

CD8 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresindeki T hücelere oranı ile tümör hücrelerinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma oranı, boyanma skoru ve boyanma şiddeti arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı (sırasıyla $p=0,867$, $p=0,888$, $p=1,000$). CD8 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresindeki T hücelere oranı ile tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerde PD-L1 oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmadı ($p=0,401$). CD8 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresindeki T hücelere oranı ile tümör mikroçevresinde ve tümör hücrelerinde PD-1 boyanma oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon gözlenmedi (sırasıyla $p=0,009$, $p=0,768$). CD8 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresindeki T hücelere oranı ile tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı ve CD68 pozitif hücre oranı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamsızdı (sırasıyla $p=0,640$, $p=0,231$). CD8 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresindeki T hücelere oranı ile tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD163 pozitif hücre sayısı ve CD163 pozitif hücre oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı (sırasıyla $p=0,765$, $p=0,463$).

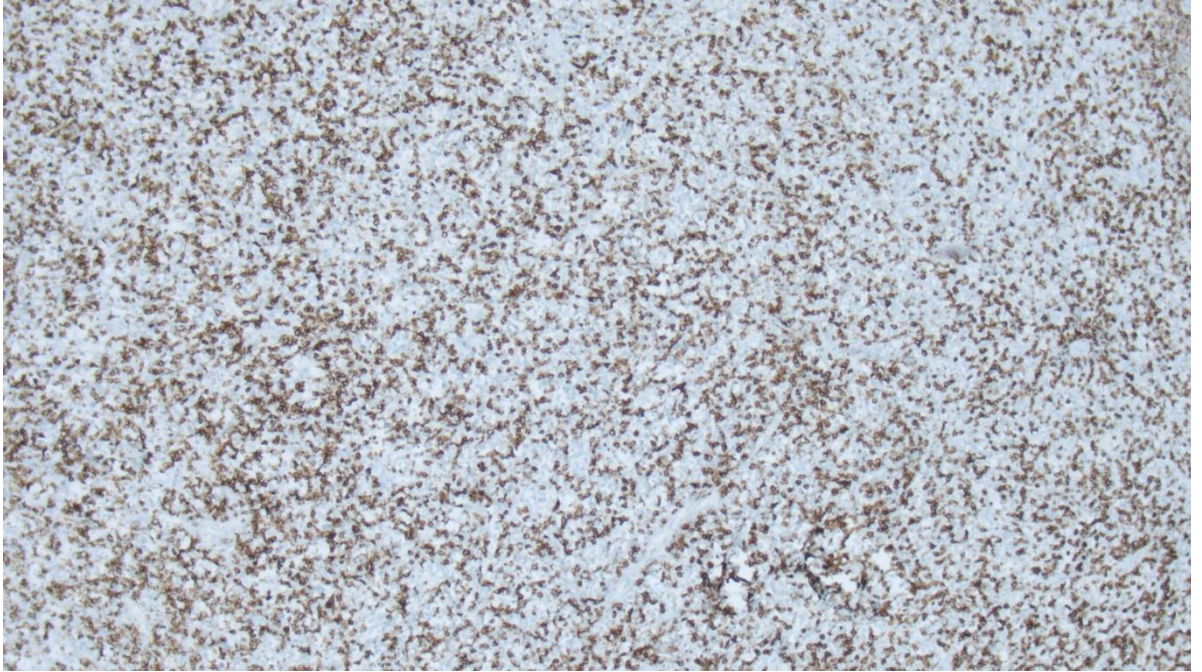
CD4 pozitif T hücrelerin ve CD8 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresindeki T hücelere oranı ile tümör mikroçevresinde FOXP3 pozitif T hücrelerin oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gözlenmedi (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,004$).

Tablo 28: Tümörde ve mikroçevresinde PD-L1, PD-1 FOXP3, CD68 CD163 ekspresyonu ile tümör mikroçevresinde CD4 ve CD8 ekspresyonu arasındaki ilişki

İmmünohistokimyasal Belirteçler	Tümör Mikroçevresinde CD4 ekspresyon oranı			Tümör Mikroçevresinde CD8 ekspresyon oranı		
	p	r	İstatistiksel Anlamlı ilişki	p	r	İstatistiksel Anlamlı ilişki
Tümörde PD-L1 ekspresyon oranı	0,889	0,011	saptanmadı	0,867	-0,013	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı	0,432	-0,062	saptanmadı	0,401	0,066	saptanmadı
Tümörde PD-1 ekspresyon oranı	0,776	0,022	saptanmadı	0,768	-0,023	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyon oranı	0,009	0,204*	saptanmadı	0,009	-0,205**	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyon oranı	0,004	0,222*	saptanmadı	0,004	-0,223**	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyon oranı	0,252	0,090	saptanmadı	0,231	-0,094	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre sayısı	0,673	0,033	saptanmadı	0,640	-0,037	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyon oranı	0,464	-0,058	saptanmadı	0,463	0,058	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı	0,765	-0,024	saptanmadı	0,765	0,024	saptanmadı



A



B

Resim 9: A.Tümör mikroçevresinde CD4 pozitif T lenfositler (DAB; 5x) B. Tümör mikroçevresinde CD8 pozitif T lenfositler (DAB; 5x)

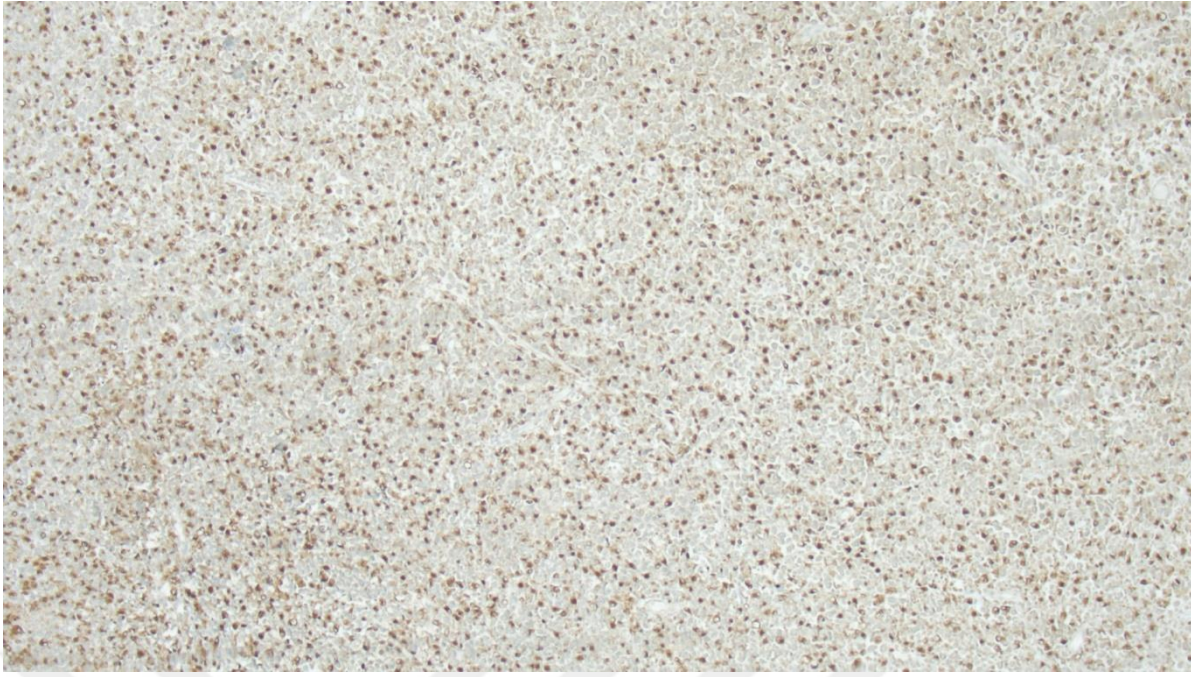
4.18 Tümör Mikroçevresinde CD68 İmmunhistokimyasal İncelemesi

İmmunhistokimyasal yöntemle CD68 ile pozitif olan hücrelerin en yoğun olduğu alandaki hücreler sayılarak 1 büyük büyütme alanında (BBA) CD68 pozitif hücre sayısı hesaplandı. 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısının medyan değeri 42 (minimum: 2-

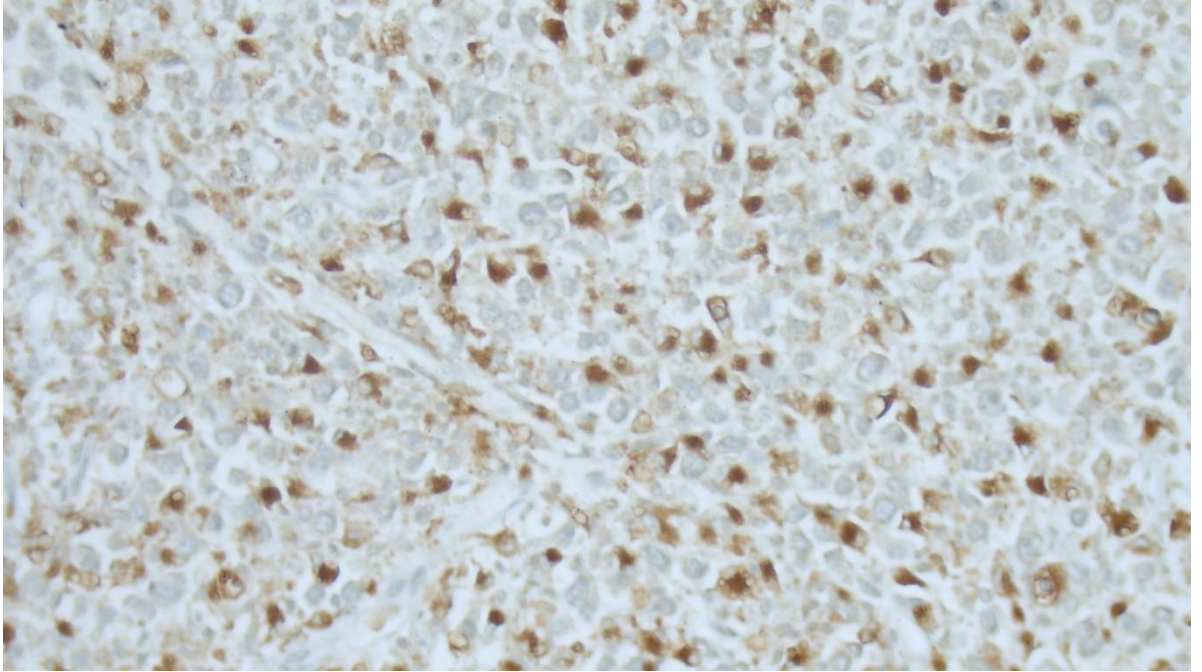
maksimum:153) olarak saptandı. Ayrıca CD68 pozitif hücrelerin tüm mikroçevreyi oluşturan hücrelere oranı değerlendirildiğinde bu oranın %1 ile %90 arasında değiştiği ve medyan değerinin %30 olduğu gözlemlendi.

Tablo 29: Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyonu gösteren hücre sayısı ve oranı

CD68 ekspresyonu	Minimum Değer	Maksimum Değer	Medyan Değer
Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre oranı (%)	1	90	30
Tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı (n)	2	153	42



A



B

Resim 10: **A.** Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyonu (DAB;5x), **B.**Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyonu (DAB; 20X)

Tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı ile tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD163 pozitif hücre sayısı ve CD163 pozitif hücre oranı arasında pozitif korelasyon saptanmış olup bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p < 0,001$, $r = 0,578$; $p < 0,001$, $r = 0,573$).

Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre oranı ile tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD163 pozitif hücre sayısı ve CD163 pozitif hücre oranı arasında pozitif korelasyon saptanmış olup bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p < 0,001$, $r = 0,556$; $p < 0,001$, $r = 0,637$).

Tablo 30: Tümörde ve mikroçevresinde PD-L1, PD-1, FOXP3, CD4, CD8, CD163 ekspresyonu ile tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyonu arasındaki ilişki

İmmünohistokimyasal Belirteçler	Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyon oranı			Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre sayısı		
	p	r	İstatistiksel Anlamlı İlişki	p	r	İstatistiksel Anlamlı İlişki
Tümörde PD-L1 ekspresyon oranı	<u>$\leq 0,001$</u>	<u>0,371</u>	pozitif korelasyon	<u>$\leq 0,001$</u>	<u>0,333</u>	pozitif korelasyon
Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı	0,185	0,104	saptanmadı	<u>$\leq 0,001$</u>	<u>0,331</u>	pozitif korelasyon
Tümörde PD-1 ekspresyon oranı	0,059	0,148	saptanmadı	0,260	0,089	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyon oranı	0,222	0,096	saptanmadı	<u>0,016</u>	<u>0,189</u>	pozitif korelasyon
Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyon oranı	0,772	0,023	saptanmadı	0,531	0,049	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD4 ekspresyon oranı	0,252	0,090	saptanmadı	0,673	0,033	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD8 ekspresyon oranı	0,231	-0,094	saptanmadı	0,640	-0,037	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyon oranı	<u>$\leq 0,001$</u>	<u>0,637</u>	pozitif korelasyon	<u>$\leq 0,001$</u>	<u>0,578</u>	pozitif korelasyon
Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı	<u>$\leq 0,001$</u>	<u>0,556</u>	pozitif korelasyon	<u>$\leq 0,001$</u>	<u>0,573</u>	pozitif korelasyon

Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre oranı ile Ki67 proliferasyon indeksi pozitif yönde korele olup istatistiksel anlamlılık saptandı ($p=0,035$, $r=0,165$). Tümör mikroçevresinde 1BBA'nda CD68 pozitif hücre sayısı ile Ki67 proliferasyon indeksi arasında anlamlılık gözlenmedi ($p=0,227$).

Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre oranı ve 1BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı ile genel sağkalım arasında anlamlılık saptanmadı (sırasıyla $p=0,625$, $p=0,422$).

Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre oranı ve 1BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı ile progresyonsuz sağkalım arasında anlamlılık saptanmadı (sırasıyla $p=0,631$, $p=0,989$).

Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre oranı ile kemik iliği infiltrasyonu, nodal ya da ektranodal tutulum, Hans algoritması, cinsiyet ve yaş arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p=0,979$, $p=0,903$, $p=0,447$, $p=0,518$, $p=0,350$).

Tümör mikroçevresinde 1BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı ile kemik iliği infiltrasyonu, nodal ya da ektranodal tutulum, Hans algoritması, cinsiyet ve yaş arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0,955$, $p=0,623$, $p=0,516$, $p=0,577$, $p=0,646$).

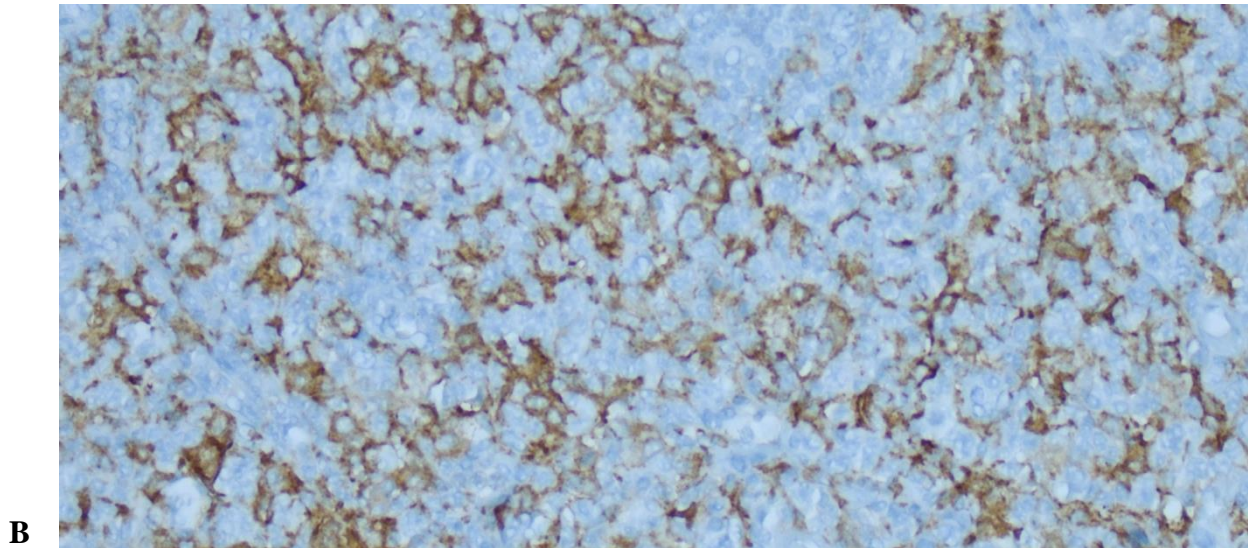
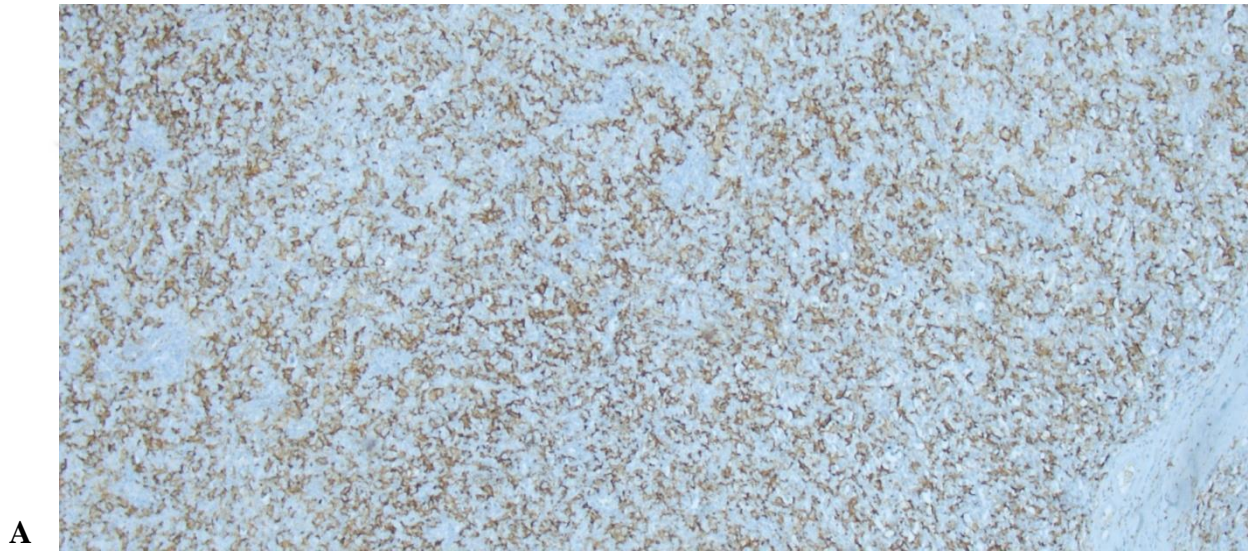
Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre oranı ve 1BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı ile tanı döneminde ölçülen serum LDH düzeyi arasındaki ilişki anlamlı bulunmadı (sırasıyla $p=0,874$, $p=0,626$).

4.19 Tümör Mikroçevresinde CD163 İmmunhistokimyasal İncelemesi

İmmunhistokimyasal yöntemle CD163 ile pozitif olan hücrelerin en yoğun olduğu alandaki hücreler sayılarak 1 büyük büyütme alanında (BBA) CD163 pozitif hücre sayısı hesaplandı. Olguların tamamında tümör mikroçevresinde boyanma oranı değişken olan CD163 pozitifliği bulundu. 1 BBA'da CD163 pozitif hücre sayısının medyan değeri 35 (minimum:1- maksimum:150) saptandı. Ayrıca CD163 pozitif hücrelerin tüm mikroçevreyi oluşturan hücrelere oranı değerlendirildiğinde bu oranın %1 ile %98 arasında değiştiği ve medyan değerinin %25 olduğu gözlemlendi.

Tablo 31: Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyonu

CD163 Ekspresyonu	Minimum Değer	Maksimum Değer	Medyan Değer
Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre oranı (%)	1	98	25
Tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD163 pozitif hücre sayısı (n)	1	150	35



Resim 11: **A.** Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyonu (DAB;5x), **B.**Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyonu (DAB; 20x)

Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre oranı ile Ki67 proliferasyon indeksi arasında pozitif korelasyon saptandı ($p<0,001$, $r=0,280$). Tümör mikroçevresinde 1BBA'da CD163 pozitif hücre sayısı ile Ki67 proliferasyon indeksi arasında anlamlılık gözlenmedi ($p=0,001$).

Tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD163 pozitif hücre sayısı non-GCB/ABC fenotipindeki olgularda, GCB fenotipindeki olgulara kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0,010$).

Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre oranı ve 1BBA'da CD163 pozitif hücre sayısı ile genel sağkalım arasında anlamlılık saptanmadı (sırasıyla $p=0,753$, $p=0,794$).

Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre oranı ve 1BBA'da CD163 pozitif hücre sayısı ile progresyonsuz sağkalım arasında anlamlılık saptanmadı (sırasıyla $p=0,808$, $p=0,976$).

Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre oranı ile kemik iliği infiltrasyonu, nodal ya da ektranodal tutulum, serum LDH düzeyi, cinsiyet ve yaş arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p=0,328$, $p=0,954$, $p=0,181$, $p=0,518$, $p=0,196$).

Tablo 32: Tümörde ve mikroçevresinde PD-L1, PD-1 FOXP3, CD4, CD8, CD68 ekspresyonu ile tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyonu arasındaki ilişki

İmmünohistokimyasal Belirteçler	Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyon oranı			Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı		
	p	r	İstatistiksel anlamlı ilişki	p	r	İstatistiksel anlamlı ilişki
Tümörde PD-L1 ekspresyon oranı	<u><0,001</u>	<u>0,447</u>	pozitif korelasyon	<u><0,001</u>	<u>0,419</u>	pozitif korelasyon
Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı	0,347	0,074	saptanmadı	0,652	0,036	saptanmadı
Tümörde PD-1 ekspresyon oranı	0,139	0,117	saptanmadı	0,144	0,115	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyon oranı	0,806	-0,019	saptanmadı	0,834	-0,017	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyon oranı	0,064	-0,145	saptanmadı	0,068	-0,143	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD4 ekspresyon oranı	0,464	-0,058	saptanmadı	0,765	-0,024	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD8 ekspresyon oranı	0,463	0,058	saptanmadı	0,765	0,024	saptanmadı
Tümör mikroçevresinde CD68 ekspresyon oranı	<u><0,001</u>	<u>0,637</u>	pozitif korelasyon	<u><0,001</u>	<u>0,556</u>	pozitif korelasyon
Tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre sayısı	<u><0,001</u>	<u>0,578</u>	pozitif korelasyon	<u><0,001</u>	<u>0,573</u>	pozitif korelasyon

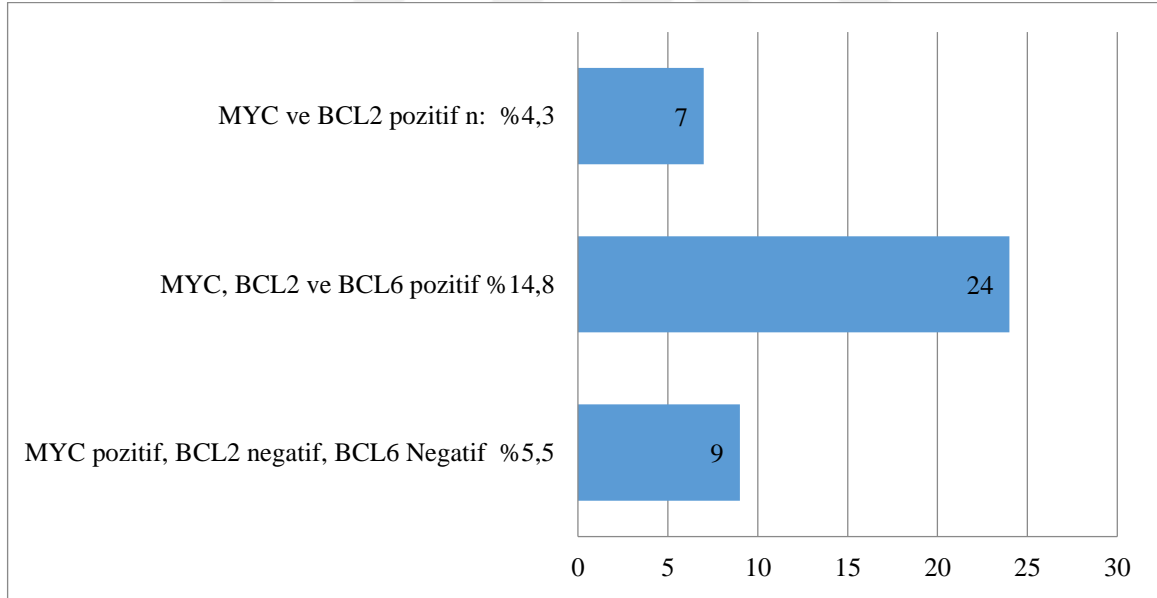
Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre sayısı ile kemik iliği infiltrasyonu, nodal ya da ekstranodal tutulum, serum LDH düzeyi, cinsiyet ve yaş arasında anlamlı ilişki bulunmadı (p= 0,148, p=0,789, p=0, 135, p=0,776, p=0,075).

4.20 İmmunhistokimyasal Yöntemle Yalnızca MYC pozitif, MYC ve BCL2 pozitif, MYC ve BCL2 ve BCL6 Pozitif Olguların Progresyon Açısından Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen olguların dokuzunda (%5,5) immunhistokimyasal yöntemle MYC pozitif, BCL2 negatif ve BCL6 pozitif saptandı. Bu olguların ikisinde (%22,2) progresyon belirlendi. Olguların progresyonsuz sağkalım süresi ortalama 91,6 ay olarak değerlendirildi ancak istatistiksel anlamlı ilişki bulunmadı (p=0,338).

Çalışmaya dahil edilen olguların yedisinde (%4,3) immunhistokimyasal yöntemle MYC ve BCL2 pozitif, BCL6 negatif saptandı. Bu olguların birinde (%14,3) progresyon belirlendi. Olguların progresyonsuz sağkalım süresi ortalama 95,6 ay olarak değerlendirildi ancak istatistiksel anlamlı ilişki bulunmadı (p=0,728).

Çalışmaya dahil edilen olguların 24'ünde (%14,8) immunhistokimyasal yöntemle MYC, BCL2 ve BCL6 pozitif saptandı. Bu olguların üçünde (%12,5) progresyon belirlendi. Olguların progresyonsuz sağkalım süresi ortalama 103,3 ay olarak değerlendirildi ancak istatistiksel anlamlı ilişki bulunmadı (p=0,472).



Şekil 14: MYC, BCL2 ve BCL6 immunhistokimyasal belirteçlerinin ekspresyon oranı

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda “DBBHL, spesifiye edilemeyen (NOS)” tanısı alan 163 olguda immunhistokimyasal yöntemle tümör hücrelerindeki PD-L1, FOXP3 ve PD-1 ekspresyonu ve tümör mikroçevresindeki hücrelerde PD-L1, FOXP3, PD-1, CD4, CD8, CD68, CD163 ekspresyonu ile sağkalım ve progresyon verileri, demografik ve klinik özellikler, diğer immunhistokimyasal parametreler arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmaya dahil edilen olguların medyan tanı yaşı 62 (minimum:13-maksimum:92) olarak belirlendi. Literatürde de DBBHL’ ların çocuk ve genç erişkinlerde de görülebildiği, ileri yaşta daha sık görüldüğü ve ortalama görülme yaşının 7.dekad olduğu bildirilmiştir (1). Olguların 83’ü (%50,9) kadın, 80’i (%49,1) erkekti. Literatürde erkeklerde kadınlardan hafifçe artmış oranlarda görüldüğü belirtilmiştir (1).

Olgular tanı anında belirlenen tümör lokalizasyon bölgeleri açısından ele alındığında olguların 78’inde (%47,9) nodal tutulum, 85’inde (%52,1) ektranodal tutulum saptandı. Literatürde tanı anında ektranodal tutulum oranının %40 olduğu belirtilmiştir (1). Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak en sık nodal tutulum bölgesinin baş ve boyun yerleşimli lenf nodülleri, en sık ektranodal tutulum bölgesinin gastrointestinal traktüs olduğu belirlenmiştir (1).

Çalışmamızda yer alan olguların bir yıllık genel sağkalım oranı %92,4; üç yıllık genel sağkalım oranı %84,6 ve beş yıllık genel sağkalım oranı %80 olarak hesaplandı. Olguların bir yıllık progresyonsuz sağkalım oranı %87,3; üç yıllık progresyonsuz sağkalım oranı %77 ve beş yıllık progresyonsuz sağkalım oranı %73,1 olarak bulundu. Literatürde ise R-CHOP döneminde DBBHL, NOS hastalarının beş yıllık progresyonsuz sağkalım oranı %60 ve toplam sağkalım oranı %65 dolayında olduğu belirtilmiştir (143). Ancak prognoz, tedavi yanıtı ve sağkalımı değerlendirme amacıyla kullanılan sistemler olan “Ann-Arbor” evreleme sistemi ve uluslararası prognostik indeks (IPI) risk gruplarına göre hastaların genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım oranları değişkenlik göstermektedir (195). Çalışmamızda hastaların evrelerine ve uluslararası prognostik indeks risk gruplarını belirlemek için gerekli verilerin tamamına ulaşamadığından sağkalım oranlarının, evre ve IPI skorları ile ilişkisini değerlendiremedik.

Takip süresince öldüğü belirlenen hastaların ortalama tanı yaşı $68,6 \pm 15,2$; sağ olan hastaların $56,8 \pm 15,3$ olarak hesaplandı. “Cox regresyon” analizi ile değerlendirme yapıldığında tanı yaşı artışının genel sağkalım açısından 1,066 kat artmış riske sahip olduğu bulundu (%95 Güven Aralığı;1,035-1,098) ($p < 0,001$). Ayrıca tanı yaşı ile progresyonsuz sağkalım ilişkisinin değerlendirilmesi sonucunda artan tanı yaşının progresyonsuz sağkalım açısından 1,036 kat artmış riske sahip olduğu belirlendi (Güven Aralığı:1,002-1,070) ($p = 0,034$). Literatürde de hastanın yaşının sağkalımı etkileyen önemli faktörlerden biri olduğu ortaya konulmuştur (1).

Progresyonsuz sağkalım ile immunhistokimyasal yöntemle tümör mikroçevresinde CD4 pozitif T hücre oranı ve CD8 pozitif T hücre oranı arasındaki ilişki değerlendirildi. Tümör mikroçevresinde CD4 pozitif T hücre oranı, progresyon saptanan olgularda ortalama $38,8 \pm 22,6$ (min-maks:%5-%90), progresyon bulunmayan olgularda $48,1 \pm 25$ (min-maks:%5- %80) olarak bulundu. Tümör mikroçevresinde CD4 pozitif hücre oranı ile progresyonsuz sağkalım arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p = 0,068$). Tümör mikroçevresinde CD8 pozitif T hücre oranı, progresyon saptanan olgularda ortalama $61,6 \pm 22,6$ (min-maks:%10-%95), progresyon bulunmayan olgularda $51,9 \pm 25$ (min-maks:%20-%95) olarak bulundu. Tümör mikroçevresinde CD8 pozitif hücre oranı ile progresyonsuz sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p = 0,054$). Xu ve arkadaşlarının, *de novo* DBBHL olgularında tümör infiltre eden lenfositleri flow sitometri ile değerlendirdikleri çalışmasında CD4/ CD8 T hücre oranındaki artışın daha iyi sağkalım ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (196). Leivonen ve arkadaşlarının çalışmasında, primer testiküler lenfoma olgularında tümör mikroçevresinde T hücrelerin gen profilinin ve immunhistokimyasal özelliklerinin değerlendirilmesi sonucunda CD4 pozitif T hücrelerin ve CD8 pozitif T hücrelerin arttığı inflamatuvar hücreden zengin mikroçevrenin daha iyi prognoz ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (197). Ansell ve arkadaşlarının çalışmasında, büyük B hücreli non-Hodgkin lenfoma olgularında flow sitometri ile değerlendirilen CD4 pozitif T hücrelerin oranındaki artışın iyi prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (187). Çalışmamızda immunhistokimyasal yöntemle CD4 ve CD8 pozitif hücre oranları ile sağkalım arasındaki ilişkinin anlamlı olmamasının, literatürde yer alan çalışmalarda immunhistokimyasal incelemelere destek olarak flow sitometri ya da gen profili gibi yöntemlerin de kullanılmış olması ile ilişkili olabileceğini düşündük.

PD-L1 fizyolojik olarak B hücreler, T hücreler ve makrofajların yüzeyinde ekspresyon gösterir (191). PD-L1, PD-1 reseptörüne bağlanarak sitokin üretimini ve T hücrelerinin hücre

siklusunda ilerlemesini inhibe etmektedir (29,30). PD-1 ve PD-L1 etkileşimi T hücre aracılı immün yanıt mekanizmasında önemli bir kontrol noktası görevine sahiptir (31). Normalde immün kontrol noktası, immün yanıtı “down regüle” etmeye yardımcı bir sistemdir, ancak bu mekanizma bazı tümörler tarafından immün kaçış için kullanılmaktadır. İmmün kontrol noktası yolakları ile oluşturulan terapötik girişim immün kontrol noktası blokajı olarak adlandırılmakta olup pek çok tümör tipinde belirgin başarı sağlamıştır. Son dönemde en geniş kapsamda çalışılan kontrol noktası PD-1 ve ligandlarıdır (193). DBBHL’lerde de PD-L1, hem neoplastik B hücrelerde hem de makrofajlar gibi tümör mikroçevresini oluşturan non-neoplastik hücrelerde eksprese edilebilir (191). Bu sebeple biz de çalışmamızda PD-L1 ve PD-1 ekspresyonunu hem tümör hücrelerinde hem de tümör mikroçevresinde değerlendirdik.

PD-L1 belirtecinin tümör hücrelerindeki ekspresyonu sitoplazmik ve/veya membranöz boyanma oranı, boyanma şiddeti ve boyanma skoru şeklinde değerlendirildi. Çalışmamızda 41 olguda PD-L1 ile tümör hücrelerinde sitoplazmik ve/veya membranöz pozitiflik (%25,2) saptandı. PD-L1 ekspresyonu bulunan olgularda sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 pozitif tümör hücrelerinin tüm tümör hücrelerine oranı %1-%100 arasında değişmekte idi. Literatürde DBBHL olgularında PD-L1 ekspresyonu %20-30 dolayında bildirilmiş olmakla birlikte, pozitiflik için kabul edilen eşik değer farklı olması (%5-30 arasında değişen) ve tümör hücreleri yanı sıra tümör mikroçevresinde bulunan diğer hücrelerde de eksprese edilmesi sebebi ile bildirilen pozitiflik oranları oldukça değişkendir (30,191,192). Konstantinos ve arkadaşlarının çalışmasında DBBHL’lerde tümörde PD-L1 ekspresyonunun genetik profili araştırılmış, 163 hastanın 49’unda (%26,4) PD-L1/PD-L2 lokusunda translokasyon ya da amplifikasyonlar yanı sıra immunhistokimyasal yöntemle de PD-L1 ekspresyonu saptanmıştır (198).

PD-L1 immunhistokimyasal yöntemle tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerde değerlendirildi. Olguların 57’sinde (%35) tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerde PD-L1 pozitifliği mevcuttu. Tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerde PD-L1 boyanma oranı %1 ile %70 arasında değişmekte olup ortalama %6,9 olarak bulundu. Tümör mikroçevresinde immunhistokimyasal yöntemle PD-1 pozitif hücre oranı araştırıldı. Olguların 108 tanesinde (%66,3) tümör mikroçevresinde PD-1 pozitif hücre saptandı. Bu olgularda tümör mikroçevresinde PD-1 pozitif hücrelerin tüm mikroçevreyi oluşturan hücrelere oranı %1 ile %90 arasında değişmekte olup ortalama %14,85 olarak belirlendi. Kwon ve arkadaşlarının çalışmasında da mikroçevrede PD-1 pozitif hücre oranı %68,6 olarak bildirilmiştir (194). Ancak tümör hücresinde PD-L1 boyanma oranı ve skoru ile tümör mikroçevresinde bulunan

hücrelerde PD-1 boyanma oranı arasında anlamlı ilişki bulunmadı (sırasıyla $p=0,639$, $p=0,658$). Kwon ve arkadaşlarının çalışmasında 126 DBBHL olgusu araştırılmış, tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu ile TİL'lerde PD-1 ekspresyonu korele bulunduğu bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada kullanılan PD-L1 klonunun E1LN3 olduğu belirtilmiştir (194). Tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerde PD-L1 boyanma oranı ile tümör mikroçevresinde PD-1 pozitif hücre oranı ve skoru karşılaştırıldığında pozitif yönde anlamlı ilişki bulundu (sırasıyla $r=0,354$, $p<0,001$; $r=0,391$, $p<0,001$). Kiyasu ve arkadaşlarının çalışmasında, tümörde ve tümör mikroçevresinde PD-L1 pozitif olan olgularda PD-1 pozitif tümör infiltre eden lenfositlerin daha az sayıda bulunduğu saptanmıştır (30). Çalışmamızda PD-L1 ve PD-1 pozitif hücreler arasındaki ilişkinin farkı her iki immunhistokimyasal belirtecin hem tümör hücrelerinde hem de mikroçevrede bulunan hücrelerde ekspresyon gösterebilmesinden kaynaklanabilir.

Genel sağkalım ve progresyon durumu açısından değerlendirildiğinde PD-L1 ile tümör hücrelerinde ekspresyon bulunan 41 olgunun 10'unun (%24,4) progrese olduğu, 12'sinin (%29,3) öldüğü belirlendi. Ancak tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyon oranı ile genel sağkalım oranı ve progresyonsuz sağkalım oranı arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p=0,211$, $p=0,723$). Tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerde PD-L1 boyanma oranı ile genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım arasında anlamlı ilişki bulunmadı (sırasıyla $p=0,530$, $p=0,129$). Kiyasu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada "DBBHL, spesifiye edilemeyen (NOS)" ve spesifik tiplerinden oluşan ve 1253 hastayı içeren seride PD-L1 pozitif hastaların toplam sağkalım oranlarının PD-L1 negatif olan hastalara oranla daha düşük olduğu saptanmış, tümör mikroçevresinde PD-L1 pozitifliği ile sağkalım arasında ilişki bulunmamıştır. Ancak bu çalışmada PD-L1 ve PAX5 ile dual immunhistokimyasal boyama yapılmış, PAX5 nükleer boyanması ile tümör hücresindeki pozitiflik ile mikroçevredeki pozitiflik ayrımı değerlendirilmiştir (30). Literatürde non-Hodgkin lenfomalarda PD-L1'in prognostik öneminin değerlendirildiği bir meta analiz çalışmasında DBBHL'lerde artmış PD-L1 ekspresyonunun kötü prognostik özellik olduğu sonucuna ulaşılmıştır (4). Kwon ve arkadaşlarının çalışmasında ise tümörde PD-L1 pozitif ve negatif olgular arasında prognostik açıdan farklılık olmadığı belirtilmiştir (194). Literatürde tümörde PD-L1 ekspresyonu ile prognostik parametreler arasındaki ilişkiye dair çelişkili sonuçlar bulunmasının sebebinin kullanılan antikör klon farklılıkları, PD-L1 pozitifliği için kabul gören bir eşik değer bulunmaması yanı sıra tümör mikroçevresinde de pozitifliği sebebi ile immunhistokimyasal

olarak tümör hücrelerindeki ekspresyonun değerlendirilmesinin güçlüğü olabileceği varsayılmaktadır (194).

Nodal yerleşimli olgularda ektranodal yerleşimli olgulara kıyasla tümör hücrelerinde ve mikroçevresinde PD-L1 boyanma oranı anlamlı olarak daha yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,013$, $p=0,001$). Ancak nodal yerleşimli olgular ile ektranodal yerleşimli olgular arasında sağkalım açısından anlamlı ilişki saptanmadı (sırasıyla $p=0,988$, $p=0,915$).

İmmunhistokimyasal yöntemle 41 olgunun 26'sında (%63,4) BCL6 pozitifliği belirlendi. BCL6 pozitif olgularda tümör hücresinde PD-L1 boyanma oranı BCL6 negatif gruba kıyasla anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p=0,025$). İmmunhistokimyasal bulgular Hans algoritmasına uyarlandığında tümörde PD-L1 ekspresyonu bulunan olguların 30'unun (%73,2) ABC alt grubunda, 11'inin (%26,8) ise GCB alt grubunda yer aldığı belirlendi ancak anlamlı ilişki bulunmadı ($p=0,089$). Literatürde ise çalışmamızın sonucu ile benzer şekilde DBBHL'de PD-L1 düzeyini araştıran çalışmalarda daha kötü prognozla ilişkili olduğu bilinen ABC alt tipinde daha yüksek ekspresyon oranları saptanmıştır (191).

İmmunhistokimyasal yöntemle 163 olgunun 72'sinde (%44,2) MYC pozitif saptandı. MYC immunhistokimyasal inceleme ile pozitif saptanan olgularda negatif olgulara göre tümör hücresinde PD-L1 boyanma şiddeti ve boyanma skoru anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0,047$, $p=0,031$). Tümör hücresinde PD-L1 ekspresyonu bulunan olgularda MYC ile 22 olguda (%53,7) pozitiflik izlenmiş olup bu olgularda MYC negatif olgulara kıyasla tümör hücresinde PD-L1 boyanma oranının anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlendi ($p=0,028$). Casey ve arkadaşlarının rat model çalışmasında MYC'in tümörögenезin başlatılmasında ve devamlılığında rol oynadığı, PD-L1'in aktivasyonunu sağladığı bulunmuştur (199).

Hu ve arkadaşlarının çalışmasında ise DBBHL'lerde tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyonu ile MYC arasında negatif korelasyon olduğu ancak tümörde PD-L1 ekspresyonu ile MYC arasında anlamlı ilişki bulunmadığı bildirilmiştir (200). Bizim çalışmamızda da tümör mikroçevresinde PD-L1 pozitif hücre oranının, MYC pozitif saptanan olgularda negatif olgulara kıyasla anlamlı olarak daha düşük olduğu (negatif korelasyon) bulundu ($p=0,026$). Tümörde PD-L1 pozitif hücre oranı açısından bakıldığında ise bizim çalışmamızda anlamlı bir ilişki saptanmış olup MYC pozitif olgularda bu oran daha yüksek bulundu ($p=0,028$).

Tümör mikroçevresinde yer alan stromal hücre grupları arasında makrofajlar tümör neovaskülarizasyonunda ve progresyonundaki fonksiyonları hakkında elde edilen veriler

önem kazanmıştır (189). Tümör ilişkili makrofajların (TİM) büyüme faktörleri, sitokinler ve proteazlar üreterek tümör gelişimine ve progresyonuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir (23). Tümör ilişkili makrofajların (TİM) genellikle M2 polarize fenotipte görülen özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir (189). Biz de bu nedenle tümör mikroçevresinde CD68 ve CD163 immunhistokimyasal incelemeleri ile 1 BBA'da pozitif hücre sayısını ve pozitif hücre oranını değerlendirdik. 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısının medyan değeri 42, CD68 pozitif hücrelerin tüm mikroçevreyi oluşturan hücrelere oranının medyan değerinin %30 olduğu gözlemlendi. 1 BBA'da CD163 pozitif hücre sayısının medyan değeri 35, pozitif hücrelerin tüm mikroçevreyi oluşturan hücrelere oranının %25 olduğu gözlemlendi. Riihijärvi ve arkadaşlarının çalışmasında mRNA ve antijen ekspresyonu değerlendirilerek DBBHL'de tümör mikroçevresinde makrofajların prognostik etkisi araştırılmış, 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı medyan değeri 37 olarak bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda CD68 pozitif makrofaj sayısı yüksek olan tedavi öncesi hastalarda düşük olan gruba göre genel sağkalım ve beş yıllık progresyonsuz sağkalımın daha iyi, tedavi sonrasında ise tam tersine daha kötü olduğu saptanmıştır (201). Bizim çalışmamızda ise tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre oranı ve sayısı ile genel ve progresyonsuz sağkalım arasında anlamlılık saptanmadı (sırasıyla $p=0,625$, $p=0,422$, $p=0,631$, $p=0,989$). Tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre oranı ve hücre sayısı ile sağkalım arasında anlamlılık saptanmadı (sırasıyla $p=0,753$, $p=0,794$, $p=0,808$, $p=0,976$). Çalışmamızda elde ettiğimiz 1 BBA'daki CD68 ve CD163 pozitif hücre sayıları Riihijärvi ve arkadaşlarının çalışmasında bildirilen verilere benzer şekilde bulunmuş olmasına rağmen IPI risk skoru, Ann Arbor evreleri ve tedavi ile ilgili verilere ulaşamadığımız için bu veriler ile karşılaştırmasını yapamadık (201).

Çalışmamızda tümör hücresinde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 boyanma oranı ile 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı, CD68 pozitif hücrelerin mikroçevreyi oluşturan hücrelere oranı, 1 BBA'da CD163 pozitif hücre sayısı ve CD163 pozitif hücrelerin mikroçevreyi oluşturan hücrelere oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon bulundu (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$). Tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerde PD-L1 boyanma oranı ile tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı arasında pozitif yönde anlamlı ilişki belirlendi ($p<0,001$). McCord ve arkadaşlarının çalışmasında DBBHL'lerde TİM belirteçleri ile PD-L1 arasında korelasyonu destekleyen bulgular saptanmış olmakla birlikte bu durumun muhtemelen antijen bağımlı fagositozda görevli bir aktive makrofaj tipini yansıttığı ve modern immunokemoterapi ile tedavi edilen hastalarda gözlenen daha iyi klinik sonuçlara katkıda bulunduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada

geniş hasta serisinde PD-L1 ekspresyonu olguların %85-95'inde myeloid hücrelerde saptanmış ve makrofaj gen ekspresyonu ile de korele edilmiştir (190). Kwon ve arkadaşlarının çalışmasında tümör mikroçevresinde PD-L1 pozitif hücreler arasında makrofajların oranını belirlemek için CD68 ile dual boyama uygulanmış, tümör mikroçevresinde PD-L1 pozitif hücrelerin çoğunun makrofajlar olduğu belirlenmiştir (194). Bizim çalışmamızda da tümör mikroçevresinde PD-L1 pozitif hücre oranı ile CD68 ve CD163 ile pozitif hücre oranı ve sayısı arasında pozitif korelasyon saptanmış olması, makrofajların PD-L1 ekspresyonuna bağlı olabilir.

FOXP3, Treg'lerin gelişimi ve fonksiyonunda önemli yere sahip olması yanı sıra ekspresyon kaybı sonucunda Treg'lerin supresör aktivitesinin azalması sebebi ile tümör mikroçevresinde önemli fonksiyona sahiptir (187). Bu nedenle çalışmamızda immunhistokimyasal yöntemle FOXP3 ekspresyonunu değerlendirdik. Olguların 134'ünde (%82,2) tümör mikroçevresinde T hücrelerde FOXP3 pozitifliği izlendi. Bu olgularda FOXP3 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresine oranı %1 ile %85 arasında değişmekte olup ortalama %12,5 olarak saptandı. FOXP3 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresine oranı ile genel sağkalım süresi ve progresyonsuz sağkalım süresi arasında anlamlı ilişki bulunmadı (sırasıyla $p=0,823$, $p=0,990$). Literatürde FOXP3 ekspresyonu bulunan Treg'lerin DBBHL'deki prognostik rolü ile ilgili sonuçlar çelişkilidir. Na-Ri Lee ve arkadaşlarının çalışmasında 96 DBBHL olgusunda FOXP3 pozitif hücre oranı değerlendirilmiş, FOXP3 pozitif T hücre artışının daha iyi genel sağkalım için prediktif olduğu saptanmıştır (202). Tzankov ve arkadaşlarının çalışmasında da 270 primer DBBHL olgusunda ABC fenotipindeki grupta FOXP3 pozitif hücre oranının artışının kötü prognoz ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (203). Nam ve arkadaşları ise FOXP3 pozitif Treg hücre artışının daha uzun progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalım süresi ile anlamlı olarak ilişkili olduğunu saptamıştır (27).

Çalışmamızda tümör hücrelerinde PD-1 boyanma oranı ile tümör mikroçevresinde FOXP3 pozitif T hücre oranı arasında pozitif yönde anlamlı ilişki saptandı ($p=0,43$). Ancak PD-1 pozitif olgu sayısının az olması nedeniyle bu yönde net bir değerlendirme yapılamadı. Ayrıca tümör mikroçevresinde PD-1 pozitif hücrelerin tüm mikroçevreyi oluşturan hücrelere oranı ve skoru ile tümör mikroçevresinde FOXP3 pozitif T hücre oranı arasında pozitif korelasyon bulundu (sırasıyla $p<0,001$, $r=0,402$; $p<0,001$, $r=0,386$). Ahearne ve arkadaşlarının çalışmasında DBBHL'lerde PD-1 pozitif T hücrelerin oranı ve FOXP3 pozitif

T hücre oranlarının korele olduğu, ve her iki parametrenin de daha iyi klinik sonuçlar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (204).

FOXP3 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresine oranı ile tümörde PD-L1 immunhistokimyasal değerlendirmelerine ait veriler arasında anlamlı ilişki saptanmadı (sırasıyla $p=0,230$, $p=0,198$, $p=0,60$). MYC immunhistokimyasal inceleme ile pozitif saptanan olgularda negatif olgulara kıyasla tümör mikroçevresinde FOXP3 pozitif hücre oranı anlamlı olarak daha yüksekti ($p=0,004$).

Çalışmamızda immunhistokimyasal yöntemle tüm olguların 45'inde (%27,6) tümör hücrelerinde FOXP3 pozitif saptandı. Son dönemde literatürde akciğer karsinomu, meme karsinomu, pankreas karsinomu, hepatosellüler karsinom, mesane karsinomu, kolorektal karsinom, mide karsinomu ve melanomda tümör hücrelerinde FOXP3 ekspresyonu gösterilmiştir (205–213). Vadasz ve arkadaşlarının çalışmasında makrofajlarda, kanser hücrelerinde ve B hücrelerde FOXP3 ekspresyonu değerlendirilmiş; FOXP3, CD19 ve CD5 koekspresyonu gösteren “regülatuar B hücre” olarak adlandırılan hücre popülasyonu tanımlanmıştır. B regülatuar hücrelerin immün aracılıklı inflamasyonda ve otoimmün hastalıklarda “self-toleransın” sağlanmasında görevi olduğuna değinilmiştir (214). Heck ve arkadaşlarının primer kutanöz DBBHL'lerde tümör hücrelerinde FOXP3 ekspresyonunu değerlendirdikleri çalışmalarında immunhistokimyasal dual boyama yöntemi ile CD20 ve FOXP3 ekspresyonu değerlendirilmiş ve tümör hücrelerinde FOXP3 pozitif saptanan olgularda anlamlı olarak prognozun daha iyi olduğu belirtilmiştir (215). Çalışmamızda tümörde FOXP3 ekspresyonu ile progresyonsuz sağkalım arasındaki ilişki değerlendirildi ancak anlamlı bulunmadı ($p=0,783$). Tümörde FOXP3 pozitif saptanan olgularda, daha kötü prognostik özellikler olduğu bilinen Ki67 proliferasyon indeksi ve serum LDH düzeyi anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla $p=0,020$, $p=<0,001$). Tümörde FOXP3 pozitif saptanan olgular ile Hans algoritması karşılaştırıldığında daha yüksek oranda non-GCB/ABC, daha düşük oranda GCB fenotipinde olduğu saptandı. Bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,003$). Bu bulgular doğrultusunda tümörde FOXP3 ekspresyonunun daha kötü prognostik özellikler ile ilişkili olduğu sonucuna ulaştık. Ancak tümördeki FOXP3 ekspresyonunun daha kesin olarak ortaya konabilmesi için mRNA PCR, CD20 ile dual boyama, CD4 ve CD25 ile dual boyama yöntemlerinin kullanılması uygun olacaktır.

Diffüz büyük B hücreli lenfomalar oldukça değişken prognostik özelliklere sahip olgulardan oluşmaktadır. DBBHL tedavisinde standart kemoterapi rejimlerine monoklonal anti-CD20 antikoru Rituximab eklenmiş olmasına rağmen literatürde bildirilen komplet

remisyon oranı %65 dolayındadır. DBBHL olgularının önemli bir kısmında relaps veya refrakter hastalık mevcut olması yanı sıra kemoterapötiklerin toksisitesinin etkileri nedeni ile son dönemde hedefe yönelik tedaviler önem kazanmıştır. PD-1 inhibitörleri olan nivolumab ve pemrolizumab, DBBHL tedavisinde araştırılmakta olan immun kontrol noktası inhibitörleridir. Ayrıca PD-L1 inhibitörleri olan atezolizumab ve durvalumab da solid tümörler yanı sıra DBBHL olgularında da tedavi açısından değerlendirilmektedir. Solid tümörlerde kötü prognostik bir belirteç olarak değerlendirilen PD-L1 ekspresyonu, multipl myelom, akut myeloid lösemi, Hodgkin lenfoma ve non-Hodgkin lenfomaların bir kısmında da ortaya konmuş olmakla birlikte heterojen olabilmektedir (216). Biz de çalışmamızda hem prognostik farklılıkların öngörülmesinde, hem de immunmodülatör tedavilere uygun hastaların belirlenmesinde önemli olan tümör mikroçevresini ve tümör hücrelerinde PD-L1/PD-1 ekspresyonunu değerlendirdik. Tümör hücrelerinde ve tümör mikroçevresinde PD-1/PD-L1 ekspresyonu ya da tümör mikroçevresini oluşturan hücreleri değerlendirmeye yönelik yaptığımız FOXP3, CD4, CD8, CD68 ve CD163 immunhistokimyasal belirteçleri ile sağkalım analizinde anlamlı ilişki saptayamadık. Ancak prognostik öneme sahip olan Hans algoritması, kemik iliği tutulumu, serum LDH düzeyi, Ki67 proliferasyon indeksi gibi parametreler ile tümör hücrelerine ya da tümör mikroçevresine ait immunhistokimyasal özelliklere ait analizlerde farklı sonuçlar belirledik.

Hans algoritmasına göre uyarladığımız olgularda anlamlı ilişki bulunmamış olmakla birlikte tümörde PD-L1 ekspresyonu saptanan hastaların %73,2'si daha kötü prognostik olduğu bilinen ABC alt grubunda yer almaktaydı. Ayrıca tümörde PD-L1 ekspresyonu bulunan olgularda, prognostik olarak değerlendirilebilecek bir başka parametre olan Ki67 proliferasyon indeksi de anlamlı olarak daha yüksekti. İmmun kontrol noktası inhibitörlerinin hedefi olan PD-1 az sayıda olguda tümörde pozitif saptanmış olmakla birlikte, boyanma oranının artışı ile progresyon oranı açısından 0,359 kat artan riske sahip olduğu belirlendi (GA: 0,341-0,378) ($p < 0,001$). PD-L1'in tümör mikroçevresinde pozitif saptandığı olgular ise anlamlı olarak daha sıklıkla GCB alt grubundaydı. Tümörde PD-L1 ile sağkalım analizleri arasında ilişki saptanmamış olsa da KI67 proliferasyon indeksi ve ABC tipi ilişkisi sebebi ile tümörde PD-L1 ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olabileceği düşünülebilir. Bu ilişkinin net olarak ortaya konması için geniş olgu serilerinde yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

- Çalışmamızda “DBBHL, spesifiye edilemeyen (NOS)” tanılı toplam 163 olgu değerlendirildi.
- Olguların tanı aldığı dönemdeki medyan yaşı 62 olup tanı yaşı aralıkları 13 ile 92 yaş arasında değişmektedir. Olguların 83’ü (%50,9) kadın, 80’i (%49,1) erkek olarak belirlendi.
- Olgular tümör lokalizasyonu açısından ele alındığında 78’inde (%47,9) nodal tutulum, 85’inde (%52,1) ektranodal tutulum saptandı. Nodal tutulum bölgeleri arasında tüm tutulum bölgelerinin %17,8’ini oluşturan baş ve boyun yerleşimli lenf nodülleri en sık tümör tutulum bölgesi olarak saptanmışken diğer nodal tutulum bölgeleri sıklık sırasına göre; inguinal, aksiller, supraklaviküler ve intraabdominal lenf nodülü olarak belirlendi. En sık tutulum saptanan ektranodal lokalizasyonlar sıklık sırasına göre; gastrointestinal traktüs, baş-boyun bölgesi, ektranodal yumuşak doku ve tonsil olarak bulundu.
- Olguların 114’ünün (%69,9) arşivimizde kemik iliği biyopsisine dair kaydı bulunmakta olup kemik iliği biyopsisi bulunan olguların 20’sinde (%17,5) DBBHL infiltrasyonu mevcuttu.
- Olguların tanı aldıkları dönemde ölçülen serum LDH düzeyleri değerlendirildi. Laboratuvar kayıtlarına ve hasta dosyalarına ulaşılabilen toplam 157 olgunun serum LDH düzeyi 102 U/L ile 6381 U/L arasında değişmekte olup medyan düzey 399 U/L olarak hesaplandı.
- Çalışmada olguların medyan izlem süresi 81 ay (min-maks:1 ay-143 ay) olarak belirlendi. Çalışmaya dâhil edilen 163 olgunun 40’nın (%24,5) öldüğü, 29’unda (%17,8) biyopsi ya da PET/BT ile saptanan hastalık progresyonu olduğu belirlendi.
- Olguların genel sağkalım medyan değeri 115,7±4,2 ay; progresyonsuz sağkalım medyan değeri 103,8±3,4 ay olarak saptandı. Olguların bir yıllık genel sağkalım oranı %92,4; üç yıllık genel sağkalım oranı %84,6 ve beş yıllık genel sağkalım oranı %80 olarak hesaplandı. Olguların bir yıllık progresyonsuz sağkalım oranı %87,3; üç yıllık progresyonsuz sağkalım oranı %77 ve beş yıllık progresyonsuz sağkalım oranı %73,1 olarak hesaplandı.

- Progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalım ile serum LDH düzeyi, Ki67 proliferasyon indeksi, cinsiyet, nodal ya da ektranodal tutulum, kemik iliği tutulumu, Hans algoritması, BCL2, BCL6, MYC, CD10, MUM1, CD4, CD8, CD68, CD163 ekspresyonu, tümörde ve mikroçevresinde PD-L1 ve FOXP3 ekspresyonu ve tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunmadı.
- Tanı yaşı ile progresyonsuz sağkalım ilişkisinin değerlendirilmesi sonucunda artan tanı yaşının progresyonsuz sağkalım açısından 1,036 kat artmış riske sahip olduğu belirlendi (Güven Aralığı:1,002-1,070) (p=0,034).
- İmmunhistokimyasal incelemelerde CD10 ile 42 (%25,8) olguda, BCL6 ile 124 (%76,1) olguda, MUM1 ile 96 (%58,9) olguda pozitiflik mevcuttu. Hans algoritmasına göre olguların 101 tanesi (%62) non-GCB/ABC alt tipinde, 62 tanesi (%38) GCB alt tipinde değerlendirildi. Çalışmaya dahil edilen tüm olguların değerlendirilmesi sonucunda Ki67 proliferasyon indeksi medyan değeri %75 olarak bulunmuş olup değerler %10 ile %100 arasında değişmekteydi. EBER-CISH yöntemi ile tüm olguların beşinde (%3,1) az sayıda tümör hücresinde EBV pozitifliği izlendi. Olguların 72'sinde (%44,2) BCL2 ve 72'sinde (%44,2) MYC pozitif saptandı. BCL2 negatif saptanan olgularda pozitif olgulara kıyasla tümör mikroçevresinde CD68 pozitif hücre oranının ve 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısının anlamlı olarak daha fazla olduğu gözlemlendi (sırasıyla p=0,0032, p=0,032).
- MYC immunhistokimyasal inceleme ile pozitif saptanan olgularda negatif olgulara kıyasla tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyon oranı, Ki67 proliferasyon indeksi ve tümörde PD-L1 ekspresyonu anlamlı olarak daha yüksekti. (p=0,004, p=0,002, p=0,047, p=0,031).
- MYC immunhistokimyasal inceleme ile pozitif saptanan olgularda negatif olgulara kıyasla tümör mikroçevresinde CD163 pozitif hücre oranı ve PD-L1 ekspresyon oranı anlamlı olarak daha düşüktü (sırasıyla p=0,035, p=0,026).
- Çalışmamızda 41 olguda PD-L1 ile tümörde pozitiflik (%25,2) saptandı. Bu olgularda PD-L1 pozitif tümör hücrelerinin tüm tümör hücrelerine oranı %1-%100 arasında değişmekte idi. PD-L1 ile tümörde ekspresyon saptanan olguların 29'unun (%70,7) nodal, 12'sinin (%29,3) ektranodal yerleşimli olduğu belirlendi. Nodal yerleşimli olgularda ektranodal yerleşimli olgulara kıyasla tümör hücrelerinde PD-L1 boyanma oranı anlamlı olarak daha yüksek bulundu (p=0,013).
- Tümörde PD-L1 pozitifliği bulunan 41 olgunun altısında (%14,7) CD10 pozitifliği, 28'inde (%68,3) MUM1 pozitifliği saptandı ancak anlamlı ilişki saptanmadı (p=0,052, p=0,142).

Tümörde PD-L1 pozitifliği bulunan 41 olgunun 26'sında (%63,4) BCL6 pozitifliği belirlendi. BCL6 pozitif olgularda tümör hücresinde PD-L1 boyanma oranı BCL6 negatif gruba kıyasla anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p=0,025$). Bu olgular Hans algoritmasına uyarlandığında olguların 30'unun (%73,2) non-GCB/ABC alt grubunda, 11'inin (%26,8) ise GCB alt grubunda yer aldığı belirlendi ancak anlamlı ilişki bulunmadı ($p=0,089$). Tümörde PD-L1 pozitifliği bulunan olguların 22'sinde (%53,7) MYC ile pozitiflik izlenmiş olup bu olgularda MYC negatif olgulara kıyasla tümörde PD-L1 boyanma oranının anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlendi ($p=0,028$). Tümörde PD-L1 ekspresyon oranı ile Ki67 proliferasyon indeksi arasında pozitif korelasyon mevcuttu ($p=0,030$). Tümörde PD-L1 pozitifliği bulunan 41 olgunun 32'sinin (%78) arşivimizde kemik iliği biyopsisi mevcut olup yedisinde (%17,1) DBBHL tutulumu saptandı ancak anlamlı ilişki saptanmadı.

- Tümörde PD-L1 ekspresyon oranı ile 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı, CD68 ekspresyon oranı, 1 BBA'da CD163 pozitif hücre sayısı ve CD163 ekspresyon oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon bulundu ($p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$).
- Olguların 57'sinde (%35) tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyonu mevcuttu. Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı %1 ile %70 arasında değişmekte olup ortalama %6,9 olarak bulundu. Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon ile tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyonu ve skoru karşılaştırıldığında pozitif yönde anlamlı ilişki bulundu (sırasıyla $r=0,354$, $p<0,001$; $r=0,391$, $p<0,001$). Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı nodal tutulum bulunan olgularda ekstranodal tutulum bulunan olgulara göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı ($p=0,013$). Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı CD10 pozitif olgularda, CD10 negatif olgulara kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0,001$). Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranının MUM1 negatif saptanan olgularda, MUM1 pozitif olgulara kıyasla anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlendi ($p<0,001$). Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyon oranı ile Hans algoritması arasındaki ilişki değerlendirildiğinde GCB alt tipinde izlenen PD-L1 boyanma oranı, non-GCB/ABC alt tipine göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0,001$). Tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyonu ile tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı arasında pozitif yönde anlamlı ilişki belirlendi ($p<0,001$).

- Tümörde PD-1 immunhistokimyasal incelemesinde dört olguda (%2,4) pozitiflik saptandı. Olguların üçünde (%1,8) tümör hücrelerinde PD-1 boyanma oranı %100, birinde (%0,6) PD-1 boyanma oranı %40 olarak değerlendirildi. Tümörde PD-1 ekspresyonu ile tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyonu arasında pozitif yönde anlamlı ilişki saptandı (p=0,43). Tümörde PD-1 ekspresyonu ile tümörde ve tümör mikroçevresinde PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlılık saptanmadı.
- Tümörde PD-1 ekspresyonunun artışının progresyonsuz sağkalım açısından 0,359 kat artan riske sahip olduğu belirlendi (GA: 0,341-0,378) (p<0,001).
- Olguların 108 tanesinde (%66,3) tümör mikroçevresinde PD-1 pozitif hücre saptandı. Bu olgularda tümör mikroçevresinde PD-1 pozitif hücrelerin tüm mikroçevreyi oluşturan hücrelere oranı %1 ile %90 arasında değişmekte olup ortalama değer %14,85 olarak belirlendi.
- Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyonu ile tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyonu arasında pozitif korelasyon bulundu (sırasıyla p<0,001, r=0,402; p<0,001, r=0,386). Tümör mikroçevresinde PD-1 ekspresyonu ile tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı (p=0,016, r=0,189). Tümör mikroçevresinde PD-1 skoru ve tümör mikroçevresinde CD4 pozitif T hücre oranı arasında pozitif korelasyon bulundu (p=0,018, r=184). Tümör mikroçevresinde PD-1 skoru ve tümör mikroçevresinde CD8 pozitif T hücre oranı arasında negatif korelasyon bulundu (p=0,018, r=185).
- Olguların 134'ünde (%82,2) tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyonu izlendi. Bu olgularda FOXP3 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresine oranı %1 ile %85 arasında değişmekte olup ortalama %12,5 olarak saptandı. Tümör mikroçevresinde FOXP3 ekspresyonu ile tümörde PD-L1 ekspresyonu, tümör mikroçevresinde CD4 ve CD8 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmadı.
- İmmunhistokimyasal yöntemle tüm olguların 45'inde (%27,6) tümörde FOXP3 ekspresyonu saptandı. Tümörde FOXP3 pozitif saptanan olgularda Ki67 proliferasyon indeksi ve serum LDH düzeyi anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla p=0,020, p=<0,001). Tümörde FOXP3 ekspresyonu ile immunhistokimyasal olarak CD10 ekspresyonu arasında negatif yönde anlamlı ilişki saptandı (p=0,008). Tümörde FOXP3 ekspresyonu ile immunhistokimyasal olarak MUM1 ekspresyonu arasında pozitif yönde anlamlı ilişki saptandı (p<0,001). Tümörde FOXP3 ekspresyonu ile Hans algoritması karşılaştırıldığında

daha yüksek oranda non-GCB/ABC, daha düşük oranda GCB fenotipinde olduğu saptandı. Bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,003$).

- CD4 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresindeki T hücrelere oranı %5 ile %90 arasında değişen düzeyde saptanmış olup medyan değeri %45 olarak belirlendi. CD8 pozitif T hücrelerin tümör mikroçevresindeki T hücrelere oranı %10 ile %95 arasında değişen düzeyde saptanmış olup medyan değeri %55 olarak bulundu. Kemik iliği tutulumu bulunan olgularda CD4 ve CD8 ekspresyonunun, tutulumu bulunmayan olgulara göre anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0,042$, $p=0,045$).
- 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısının medyan değeri 42 (min-maks:2-153) olarak saptandı. Ayrıca CD68 pozitif hücrelerin tüm mikroçevreyi oluşturan hücrelere oranı değerlendirildiğinde bu oranın %1 ile %90 arasında değiştiği ve medyan değerinin %30 olduğu gözlemlendi. Tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD68 pozitif hücre sayısı ve oranı ile tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD163 pozitif hücre sayısı ve CD163 ekspresyon oranı arasında pozitif korelasyon saptanmış olup bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p<0,001$, $r=0,578$; $p<0,001$, $r=0,573$; $p<0,001$, $r=0,556$; $p<0,001$, $r=0,637$).
- İmmunhistokimyasal yöntemle 1 BBA'da CD163 pozitif hücre sayısının medyan değeri 35 (min-maks:1-150) saptandı. Ayrıca CD163 pozitif hücrelerin tüm mikroçevreyi oluşturan hücrelere oranı değerlendirildiğinde bu oranın %1 ile %98 arasında değiştiği ve medyan değerinin %25 olduğu gözlemlendi. Tümör mikroçevresinde CD163 ekspresyonu ile Ki67 proliferasyon indeksi arasında pozitif korelasyon saptandı ($p<0,001$, $r=0,280$). Tümör mikroçevresinde 1 BBA'da CD163 ekspresyonu ile Hans algoritması ile karşılaştırıldığında 1 BBA'da CD163 pozitif hücre sayısı non-GCB/ABC fenotipindeki olgularda, GCB fenotipindeki olgulara kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0,010$).
- Çalışmaya dahil edilen olguların dokuzunda (%5,5) immunhistokimyasal yöntemle MYC pozitif, BCL2 negatif ve BCL6 pozitif; yedisinde (%4,3) immunhistokimyasal yöntemle MYC ve BCL2 pozitif, BCL6 negatif; 24'ünde (%14,8) immunhistokimyasal yöntemle MYC, BCL2 ve BCL6 pozitif saptandı.

7. KAYNAKLAR

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H. WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues (Revised 4th edition) IARC. Lyon, France. 2017.
2. Li S, Young KH, Medeiros LJ. Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology*. 2018 Jan 1;50(1):74–87.
3. Horwitz SM, Zelenetz AD, Gordon LI, Wierda WG, Abramson JS, Advani RH, et al. NCCN Guidelines Insights: Non-Hodgkin's Lymphomas, Version 3.2016. *J Natl Compr Canc Netw*. 2016;14(9):1067–79.
4. Shu Z, Minghui Z, Yu Z, Hongxue M, Yan W, Yupeng L, et al. The prognostic value of programmed cell death ligand 1 expression in non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis. *Cancer Biol Med*. 2018;15(3):290.
5. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2375–90.
6. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004 Jan 1;103(1):275–82.
7. Hu S, Xu-Monette ZY, Balasubramanyam A, Manyam GC, Visco C, Tzankov A, et al. CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: A report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. 2013 Apr 4;121(14):2715–24.
8. Slack GW, Steidl C, Sehn LH, Gascoyne RD. CD30 expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma: A population-based study from British Columbia. *Br J Haematol*. 2014 Dec 1;167(5):608–17.
9. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated

- with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012 Oct 1;30(28):3452–9.
10. Scott DW, Mottok A, Ennishi D, Wright GW, Farinha P, Ben-Neriah S, et al. Prognostic significance of diffuse large B-cell lymphoma cell of origin determined by digital gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue biopsies. *J Clin Oncol*. 2015 Sep 10;33(26):2848–56.
 11. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*. 2011 Jan 10;29(2):200–7.
 12. Grogan TM, Lippman SM, Spier CM, Slymen DJ, Rybski JA, Rangel CS, et al. Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large cell lymphomas as determined by the monoclonal antibody Ki-67. *Blood*. 1988 Apr;71(4):1157–60.
 13. Hasselblom S, Ridell B, Sigurdardottir M, Hansson U, Nilsson-Ehle H, Andersson PO. Low rather than high Ki-67 protein expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2008 Jan;49(8):1501–9.
 14. Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S, Spier CM, Brazier RM, Banks PM, et al. Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood*. 1994 Mar 15;83(6):1460–6.
 15. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour–host interface. *Nature*. 2001 May;411(6835):375–9.
 16. Lee S, Kim DH, Oh SY, Kim SY, Koh MS, Lee JH, et al. Clinicopathologic significance of tumor microenvironment CD11c, and FOXP3 expression in diffuse large B-cell lymphoma patients receiving rituximab, cyclophosphamide, anthracycline, vincristine, and prednisone (R-CHOP) combination chemotherapy. *Korean J Intern Med*. 2017 Mar;32(2):335–44.
 17. Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev Cancer*. 2014 Aug 10;14(8):517–34.
 18. Rimsza LM, Roberts RA, Campo E, Grogan TM, Bea S, Salaverria I, et al. Loss of

- major histocompatibility class II expression in non-immune-privileged site diffuse large B-cell lymphoma is highly coordinated and not due to chromosomal deletions. *Blood*. 2006 Feb 1;107(3):1101–7.
19. Andorsky DJ, Yamada RE, Said J, Pinkus GS, Betting DJ, Timmerman JM. Programmed Death Ligand 1 Is Expressed by Non-Hodgkin Lymphomas and Inhibits the Activity of Tumor-Associated T Cells. *Clin Cancer Res*. 2011 Jul 1;17(13):4232–44.
 20. Powell DR, Huttenlocher A. Neutrophils in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol*. 2016 Jan;37(1):41–52.
 21. Yan MJ, Jurasz P. The role of platelets in the tumor microenvironment: From solid tumors to leukemia. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2016 Mar 1;1863(3):392–400.
 22. Nicholas NS, Apollonio B, Ramsay AG. Tumor microenvironment (TME)-driven immune suppression in B cell malignancy. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2016 Mar 1;1863(3):471–82.
 23. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jan;4(1):71–8.
 24. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol*. 2009 Nov 1;86(5):1065–73.
 25. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3 + regulatory T cells in the human immune system. *Nat Publ Gr*. 2010;10:490–500.
 26. Coutinho R, Clear AJ, Mazzola E, Owen A, Greaves P, Wilson A, et al. Revisiting the immune microenvironment of diffuse large B-cell lymphoma using a tissue microarray and immunohistochemistry: robust semi-automated analysis reveals CD3 and FoxP3 as potential predictors of response to R-CHOP. *Haematologica*. 2015 Mar 1;100(3):363–9.
 27. 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. *Leuk Lymphoma*. 2014 Nov 3;55(11):2466–76.

28. Kaufman HL, Russell J, Hamid O, Bhatia S, Terheyden P, D'Angelo SP, et al. Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016 Oct;17(10):1374–85.
29. Chen J, Jiang CC, Jin L, Zhang XD. Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Ann Oncol.* 2016 Mar 1;27(3):409–16.
30. Kiyasu J, Miyoshi H, Hirata A, Arakawa F, Ichikawa A, Niino D, et al. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2015 Nov 5;126(19):2193–201.
31. Zhang J, Medeiros LJ, Young KH. Cancer Immunotherapy in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Front Oncol.* 2018;8(September):1–12.
32. Gadiot J, Hooijkaas AI, Kaiser ADM, Van Tinteren H, Van Boven H, Blank C. Overall survival and PD-L1 expression in metastasized malignant melanoma. *Cancer.* 2011 May 15;117(10):2192–201.
33. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 2007 Feb 27;104(9):3360–5.
34. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 1;10(15):5094–100.
35. Topalian SL, Stephen Hodi F, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *n engl j med.* 2012;26:2443–54.
36. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu W-J, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med.* 2012 Jun 28;366(26):2455–65.
37. Gorczyca W, Weisberger J, Emmons FN. *Atlas of Differential Diagnosis in Neoplastic Hematopathology.* 1st ed. London: CRC Press; 2004.
38. <https://seer.cancer.gov/data/> [Internet]. Available from: <https://seer.cancer.gov/data/>

39. Gouveia GR, Siqueira SAC, Pereira J. Pathophysiology and molecular aspects of diffuse large B-cell lymphoma. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2012;34(6):447–51.
40. Broudy VC, Lin NL, Priestley G V, Nocka K, Wolf NS. Interaction of stem cell factor and its receptor c-kit mediates lodgment and acute expansion of hematopoietic cells in the murine spleen. *Blood.* 1996 Jun 1;88(1):75–81.
41. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: Distributions of the major subtypes differ by geographic locations. *Ann Oncol.* 1998 Jul 1;9(7):717–20.
42. Arber DA, George TI. Bone marrow biopsy involvement by non-Hodgkin's lymphoma: Frequency of lymphoma types, patterns, blood involvement, and discordance with other sites in 450 specimens. *Am J Surg Pathol.* 2005 Dec;29(12):1549–57.
43. Brudno J, Tadmor T, Pittaluga S, Nicolae A, Polliack A, Dunleavy K. Discordant bone marrow involvement in non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2016 Feb 25;127(8):965–70.
44. Campbell J, Seymour JF, Matthews J, Wolf M, Stone J, Juneja S. The prognostic impact of bone marrow involvement in patients with diffuse large cell lymphoma varies according to the degree of infiltration and presence of discordant marrow involvement. *Eur J Haematol.* 2006 Jun 1;76(6):473–80.
45. Park MJ, Park SH, Park PW, Seo YH, Kim KH, Seo JY, et al. Prognostic impact of concordant and discordant bone marrow involvement and cell-of-origin in Korean patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Pathol.* 2015 Sep 1;68(9):733–8.
46. Adams HJ, Kwee TC, de Keizer B, Fijnheer R, de Klerk JM, Nievelstein RA. FDG PET/CT for the detection of bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma: systematic review and meta-analysis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2014 Mar 27;41(3):565–74.
47. Caimi PF, Hill BT, Hsi ED, Smith MR. Clinical approach to diffuse large B cell lymphoma. *Blood Rev.* 2016 Nov 1;30(6):477–91.
48. Ott G, Ziepert M, Klapper W, Horn H, Szczepanowski M, Bernd HW, et al. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the

- DSHNHL. *Blood*. 2010 Dec 2;116(23):4916–25.
49. Engelhard M, Nter Brittinger G, Huhn D, Gerhartz HH, Meusers P, Siegert W, et al. Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. *Blood*. 1997 Apr 1;89(7):2291–7.
 50. Haralambieva E, Pulford KAF, Lamant L, Pileri S, Roncador G, Gatter KC, et al. Anaplastic large-cell lymphomas of B-cell phenotype are anaplastic lymphoma kinase (ALK) negative and belong to the spectrum of diffuse large B- cell lymphomas. *Br J Haematol*. 2000 Jun 1;109(3):584–91.
 51. Xu-Monette ZY, Tu M, Jabbar KJ, Cao X, Tzankov A, Visco C, et al. Clinical and biological significance of de novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma in Western countries. *Oncotarget*. 2015 Mar 20;6(8):5615–33.
 52. Zeng W, Fu K, Quintanilla-Fend L, Lim M, Ondrejka S, Hsi ED. Cyclin D1-negative Blastoid Mantle Cell Lymphoma Identified by SOX11 Expression. *Am J Surg Pathol*. 2012 Feb;36(2):214–9.
 53. Hsiao S, Cortada IR, Colomo L, Ye H, Liu H, Kuo S-Y, et al. SOX11 is useful in differentiating cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma from mantle cell lymphoma. *Histopathology*. 2012 Oct;61(4):685–93.
 54. Ok CY, Xu-Monette ZY, Tzankov A, O'Malley DP, Montes-Moreno S, Visco C, et al. Prevalence and clinical implications of cyclin D1 expression in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) treated with immunochemotherapy: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Cancer*. 2014 Jun 15;120(12):1818–29.
 55. Vela-Chávez T, Adam P, Kremer M, Bink K, Bacon CM, Menon G, et al. Cyclin D1 positive diffuse large B-cell lymphoma is a post-germinal center-type lymphoma without alterations in the CCND1 gene locus. *Leuk Lymphoma*. 2011 Mar;52(3):458–66.
 56. Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012 Oct 1;30(28):3460–7.

57. Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TFE, Bernd HW, Feller AC, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2013 Mar 21;121(12):2253–63.
58. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood*. 2013 May 16;121(20):4021–31.
59. Mahmoud AZ, George TI, Czuchlewski DR, Zhang Q-Y, Wilson CS, Sever CE, et al. Scoring of MYC protein expression in diffuse large B-cell lymphomas: concordance rate among hematopathologists. *Mod Pathol*. 2015 Apr 28;28(4):545–51.
60. Valera A, Lopez-Guillermo A, Cardesa-Salzmann T, Climent F, Gonzalez-Barca E, Mercadal S, et al. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica*. 2013 Oct 1;98(10):1554–62.
61. Peterson LC, Parkin JL, Arthur DC, Brunning RD. Acute basophilic leukemia: A clinical, morphologic, and cytogenetic study of eight cases. *Am J Clin Pathol*. 1991 Aug 1;96(2):160–70.
62. Dwivedi A, Mehta A, Solanki P. Evaluation of immunohistochemical subtypes in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on survival. *Indian J Pathol Microbiol*. 2015;58(4):453.
63. Colomo L, López-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martínez A, Bosch F, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2003 Jan 1;101(1):78–84.
64. De Leval L, Harris NL. Variability in immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its clinical relevance. *Histopathology*. 2003 Dec;43(6):509–28.
65. Muris JJF, Meijer CJLM, Vos W, van Krieken JHJM, Jiwa NM, Ossenkoppele GJ, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol*. 2006 Apr;208(5):714–23.
66. Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, Bigerna B, Marafioti T, Gambacorta M, et al. A

- monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood*. 2000 Mar 15;95(6):2084–92.
67. Montes-Moreno S, Roncador G, Maestre L, Martínez N, Sanchez-Verde L, Camacho FI, et al. Gcet1 (centerin), a highly restricted marker for a subset of germinal center-derived lymphomas. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):351–8.
 68. Natkunam Y, Zhao S, Mason DY, Chen J, Taidi B, Jones M, et al. The oncoprotein LMO2 is expressed in normal germinal-center B cells and in human B-cell lymphomas. *Blood*. 2007 Feb 15;109(4):1636–42.
 69. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, Krajewska M, Horsman DE, Tolcher AW, et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997 Jul 1;90(1):244–51.
 70. Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay MF, Briere J, Lavignac C, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood*. 1996 Jan 1;87(1):265–72.
 71. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A, et al. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006 Feb 20;24(6):961–8.
 72. Mottok A, Gascoyne RD. Bromodomain inhibition in diffuse large B-cell lymphoma - Giving MYC a brake. *Clin Cancer Res*. 2015 Jan 1;21(1):4–6.
 73. Hyun Yoon D, Ro Choi D, June Ahn H, Kim S, Ho Lee D, Kim S-W, et al. Ki-67 expression as a prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab plus CHOP. *Eur J Haematol*. 2010 Apr;85(2).
 74. Cheung K-JJ, Horsman DE, Gascoyne RD. The significance of TP53 in lymphoid malignancies: mutation prevalence, regulation, prognostic impact and potential as a therapeutic target. *Br J Haematol*. 2009 Aug;146(3):257–69.
 75. Leroy K, Haioun C, Lepage E, Le Metayer N, Berger F, Labouyrie E, et al. p53 gene mutations are associated with poor survival in low and low-intermediate risk diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol*. 2002 Jul 1;13(7):1108–15.
 76. Li Y, Gordon MW, Xu-Monette ZY, Visco C, Tzankov A, Zou D, et al. Single

- nucleotide variation in the TP53 3' untranslated region in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab-CHOP: A report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood*. 2013 May 30;121(22):4529–40.
77. Xu-Monette ZY, Wu L, Visco C, Tai YC, Tzankov A, Liu WM, et al. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: Report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. 2012 Nov 8;120(19):3986–96.
 78. Young KH, Leroy K, Møller MB, Colleoni GWB, Sánchez-Beato M, Kerbauy FR, et al. Structural profiles of TP53 gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma: an international collaborative study. *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3088–98.
 79. Panizo C, Garca-Muoz R. Lymphoproliferative Disorders in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Systemic Lupus Erythematosus*. InTech; 2012. 383–405 p.
 80. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000 Feb 3;403(6769):503–11.
 81. Lenz G, Staudt LM. Aggressive Lymphomas. Schwartz RS, editor. *N Engl J Med*. 2010 Apr 15;362(15):1417–29.
 82. Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, et al. Stromal Gene Signatures in Large-B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med*. 2008 Nov 27;359(22):2313–23.
 83. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The Use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2002 Jun 20;346(25):1937–47.
 84. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci*. 2003 Aug 19;100(17):9991–6.
 85. Hwang HS, Park C-S, Yoon DH, Suh C, Huh J. High concordance of gene expression profiling-correlated immunohistochemistry algorithms in diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. *Am J Surg Pathol*. 2014 Aug;38(8):1046–57.
 86. Li T, Medeiros LJ, Lin P, Yin H, Littlejohn M, Im W, et al. Immunohistochemical profile and fluorescence in situ hybridization analysis of diffuse large B-cell lymphoma

- in northern China. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 May;134(5):759–65.
87. Seki R, Ohshima K, Fujisaki T, Uike N, Kawano F, Gondo H, et al. Prognostic impact of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Cancer Sci*. 2009 Oct;100(10):1842–7.
 88. Shiozawa E, Yamochi-Onizuka T, Takimoto M, Ota H. The GCB subtype of diffuse large B-cell lymphoma is less frequent in Asian countries. *Leuk Res*. 2007 Nov;31(11):1579–83.
 89. Xia ZG, Xu ZZ, Zhao WL, Zhao SQ, Ding F, Chen Y, et al. The prognostic value of immunohistochemical subtyping in Chinese patients with de novo diffuse large B-cell lymphoma undergoing CHOP or R-CHOP treatment. *Ann Hematol*. 2010 Feb 11;89(2):171–7.
 90. Scott DW, Wright GW, Williams PM, Lih C-J, Walsh W, Jaffe ES, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood*. 2014 Feb 20;123(8):1214–7.
 91. Mareschal S, Ruminy P, Bagacean C, Marchand V, Cornic M, Jais JP, et al. Accurate classification of germinal center B-cell-like/activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma using a simple and rapid reverse transcriptase-multiplex ligation-dependent probe amplification assay: A CALYM study. *J Mol Diagnostics*. 2015 Apr 9;17(3):273–83.
 92. Choi WWL, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*. 2009 Sep 1;15(17):5494–502.
 93. Coutinho R, Clear AJ, Owen A, Wilson A, Matthews J, Lee A, et al. Poor concordance among nine immunohistochemistry classifiers of cell-of-origin for diffuse large b-cell lymphoma: Implications for therapeutic strategies. *Clin Cancer Res*. 2013 Dec 15;19(24):6686–95.
 94. Natkunam Y, Farinha P, Hsi ED, Hans CP, Tibshirani R, Sehn LH, et al. LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. *J Clin Oncol*. 2008 Jan 20;26(3):447–54.
 95. Nyman H, Jerkeman M, Karjalainen-Lindsberg ML, Banham AH, Leppä S. Prognostic

- impact of activated B-cell focused classification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Mod Pathol*. 2009 Aug 15;22(8):1094–101.
96. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Green TM, Li Y, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: A report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortiu. *Leukemia*. 2012 Sep 22;26(9):2103–13.
 97. Read JA, Koff JL, Nastoupil LJ, Williams JN, Cohen JB, Flowers CR. Evaluating cell-of-origin subtype methods for predicting diffuse large B-Cell lymphoma survival: A meta-analysis of gene expression profiling and immunohistochemistry algorithms. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk*. 2014 Dec;14(6):460–7.
 98. Dunleavy K, Pittaluga S, Czuczman MS, Dave SS, Wright G, Grant N, et al. Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2009 Jun 11;113(24):6069–76.
 99. Mathews Griner LA, Guha R, Shinn P, Young RM, Keller JM, Liu D, et al. High-throughput combinatorial screening identifies drugs that cooperate with ibrutinib to kill activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2014 Feb 11;111(6):2349–54.
 100. Nowakowski GS, Laplant B, Habermann TM, Rivera CE, MacOn WR, Inwards DJ, et al. Lenalidomide can be safely combined with R-CHOP (R2CHOP) in the initial chemotherapy for aggressive B-cell lymphomas: Phase I study. *Leukemia*. 2011 Dec 1;25(12):1877–81.
 101. Nowakowski GS, LaPlant B, Macon WR, Reeder CB, Foran JM, Nelson GD, et al. Lenalidomide combined with R-CHOP overcomes negative prognostic impact of non-germinal center B-cell phenotype in newly diagnosed diffuse large B-cell lymphoma: A phase II study. *J Clin Oncol*. 2015 Jan 20;33(3):251–7.
 102. Offner F, Samoilova O, Osmanov E, Eom HS, Topp MS, Raposo J, et al. Frontline rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone with bortezomib (VR-CAP) or vincristine (R-CHOP) for non-GCB DLBCL. *Blood*. 2015 Oct 15;126(16):1893–901.
 103. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, et al. Targeting B

- cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med*. 2015 Aug 20;21(8):922–6.
104. Yang Y, Shaffer AL, Emre NCT, Ceribelli M, Zhang M, Wright G, et al. Exploiting Synthetic Lethality for the Therapy of ABC Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell*. 2012 Jun 12;21(6):723–37.
 105. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci*. 2012 Mar 6;109(10):3879–84.
 106. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*. 2011 Aug 27;476(7360):298–303.
 107. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet*. 2011 Sep;43(9):830–7.
 108. Zhang J, Grubor V, Love C. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jan 22;110(1398):403.
 109. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010 Jan 7;463(7277):88–92.
 110. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet*. 2010 Feb 17;42(2):181–5.
 111. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim KH, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011 Feb 3;470(7332):115–21.
 112. Lenz G, Wright GW, Emre NCT, Kohlhammer H, Dave SS, Davis RE, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci*. 2008 Sep 9;105(36):13520–5.
 113. Monti S, Chapuy B, Takeyama K, Rodig SJ, Hao Y, Yeda KT, et al. Integrative Analysis Reveals an Outcome-Associated and Targetable Pattern of p53 and Cell Cycle Deregulation in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell*. 2012 Sep 11;22(3):359–72.

114. Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V, et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*. 2005 Nov 1;106(9):3183–90.
115. Green MR, Aya-Bonilla C, Gandhi MK, Lea RA, Wellwood J, Wood P, et al. Integrative genomic profiling reveals conserved genetic mechanisms for tumorigenesis in common entities of non-Hodgkin's lymphoma. *Genes Chromosom Cancer*. 2011 May;50(5):313–26.
116. Jardin F, Jais JP, Molina TJ, Parmentier F, Picquenot JM, Ruminy P, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with CDKN2A deletion have a distinct gene expression signature and a poor prognosis under R-CHOP treatment: A GELA study. *Blood*. 2010 Aug 19;116(7):1092–104.
117. Lu T-X, Fan L, Wang L, Wu J-Z, Miao K-R, Liang J-H, et al. MYC or BCL2 copy number aberration is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*. 2015 Jul 30;6(21):18374–88.
118. Yoon SO, Jeon YK, Paik JH, Kim WY, Kim YA, Kim JE, et al. MYC translocation and an increased copy number predict poor prognosis in adult diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), especially in germinal centre-like B cell (GCB) type. *Histopathology*. 2008 Aug;53(2):205–17.
119. Taniguchi K, Takata K, Chuang SS, Miyata-Takata T, Sato Y, Satou A, et al. Frequent MYD88 L265P and CD79B mutations in primary breast diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2016 Mar;40(3):324–34.
120. Chen YW, Hu XT, Liang AC, Au WY, So CC, Wong ML, et al. High BCL6 expression predicts better prognosis, independent of BCL6 translocation status, translocation partner, or BCL6-deregulating mutations, in gastric lymphoma. *Blood*. 2006 Oct 1;108(7):2373–83.
121. Deng L, Xu-Monette ZY, Loghavi S, Manyam GC, Xia Y, Visco C, et al. Primary testicular diffuse large B-cell lymphoma displays distinct clinical and biological features for treatment failure in rituximab era: A report from the International PTL Consortium. *Leukemia*. 2016 Feb 26;30(2):361–72.
122. Chapuy B, Roemer MGM, Stewart C, Tan Y, Abo RP, Zhang L, et al. Targetable

- genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas. *Blood*. 2016 Feb 18;127(7):869–81.
123. Twa DDW, Mottok A, Chan FC, Ben-Neriah S, Woolcock BW, Tan KL, et al. Recurrent genomic rearrangements in primary testicular lymphoma. *J Pathol*. 2015 Jun;236(2):136–41.
 124. Booman M, Douwes J, Glas AM, Riemersma SA, Jordanova ES, Kok K, et al. Mechanisms and effects of loss of human leukocyte antigen class II expression in immune-privileged site-associated B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2006 May 1;12(9):2698–705.
 125. Jordanova ES, Riemersma SA, Philippo K, Giphart-Gassler M, Schuurin E, Kluin PM. Hemizygous deletions in the HLA region account for loss of heterozygosity in the majority of diffuse large B-cell lymphomas of the testis and the central nervous system. *Genes Chromosom Cancer*. 2002 Sep;35(1):38–48.
 126. Akasaka T, Ueda C, Kurata M, Akasaka H, Yamabe H, Dc W, et al. Nonimmunoglobulin (non-Ig)/ BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma results in worse prognosis than Ig / BCL6. October. 2000 Oct 15;96(8):2907–9.
 127. Barrans SL, O'Connor SJM, Evans PAS, Davies FE, Owen RG, Haynes AP, et al. Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2002 May;117(2):322–32.
 128. Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP, Lenormand B, Rossi A, Pezzella F, et al. LA23 Rearrangements in Non-Hodgkin's Lymphoma: Correlation with Histology, Immunophenotype, Karyotype, and Clinical Outcome in 217 Patients. *Blood*. 1994 May 1;9(1):2423–7.
 129. Offit K, Coco F Lo, Louie DC, Parsa NZ, Leung D, Portlock C, et al. Rearrangement of the bcl-6 Gene as a Prognostic Marker in Diffuse Large-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2002 Jul 14;331(2):74–80.
 130. Iqbal J, Greiner TC, Patel K, Dave BJ, Smith L, Ji J, et al. Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2007 Nov 12;21(11):2332–43.
 131. Ye Q, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Deng L, Wang X, Manyam GC, et al. Prognostic impact of concurrent MYC and BCL6 rearrangements and expression in de novo

- diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*. 2016 Jan 19;7(3):2401–16.
132. Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC, Staudt LM, Weisenburger DD, Pickering DL, et al. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood*. 2002 Apr 1;99(7):2285–90.
 133. Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Tai YC, Li Y, et al. Patients with diffuse large B-cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: A report from an international DLBCL rituximab-CHOP consortium program study. *Haematologica*. 2013 Feb 1;98(2):255–63.
 134. Akyurek N, Uner A, Benekli M, Barista I. Prognostic significance of MYC, BCL2, and BCL6 rearrangements in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone plus rituximab. *Cancer*. 2012 Sep 1;118(17):4173–83.
 135. Barrans S, Crouch S, Smith A, Turner K, Owen R, Patmore R, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 10;28(20):3360–5.
 136. Copie-Bergman C, Cuillière-Dartigues P, Baia M, Briere J, Delarue R, Canioni D, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: A GELA/LYSA study. *Blood*. 2015 Nov 26;126(22):2466–74.
 137. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, Ben-Neriah S, Woods R, Steidl C, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: The critical factors associated with survival. *Blood*. 2009 Sep 10;114(11):2273–9.
 138. Muñoz-Mármol AM, Sanz C, Tapia G, Marginet R, Ariza A, Mate JL. MYC status determination in aggressive B-cell lymphoma: The impact of FISH probe selection. *Histopathology*. 2013 Sep;63(3):418–24.
 139. Scott DW, Mungall KL, Ben-Neriah S, Rogic S, Morin RD, Slack GW, et al. TBL1XR1/TP63: A novel recurrent gene fusion in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2012 May 24;119(21):4949–52.
 140. Cerhan JR, Berndt SI, Vijai J, Ghesquières H, McKay J, Wang SS, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for diffuse large B cell

- lymphoma. *Nat Genet.* 2014 Nov 28;46(11):1233–8.
141. Kumar V, Matsuo K, Takahashi A, Hosono N, Tsunoda T, Kamatani N, et al. Common variants on 14q32 and 13q12 are associated with DLBCL susceptibility. *J Hum Genet.* 2011 Jun 7;56(6):436–9.
 142. Bassig BA, Cerhan JR, Au WY, Kim HN, Sangrajrang S, Hu W, et al. Genetic susceptibility to diffuse large B-cell lymphoma in a pooled study of three Eastern Asian populations. *Eur J Haematol.* 2015 Nov;95(5):442–8.
 143. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: Optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood.* 2015 Jan 1;125(1):22–32.
 144. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood.* 2007 Mar 1;109(5):1857–61.
 145. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, Gordon LI, LaCasce AS, Crosby-Thompson A, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood.* 2014 Feb 6;123(6):837–42.
 146. Carson KR, Bartlett NL, McDonald JR, Luo S, Zeringue A, Liu J, et al. Increased body mass index is associated with improved survival in United States veterans with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2012 Sep 10;30(26):3217–22.
 147. Drake MT, Maurer MJ, Link BK, Habermann TM, Ansell SM, Micallef IN, et al. Vitamin D insufficiency and prognosis in non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2010 Sep 20;28(27):4191–8.
 148. Hong F, Habermann TM, Gordon LI, Hochster H, Gascoyne RD, Morrison VA, et al. The role of body mass index in survival outcome for lymphoma patients: US intergroup experience. *Ann Oncol.* 2014 Mar;25(3):669–74.
 149. Maurer MJ, Micallef INM, Cerhan JR, Katzmann JA, Link BK, Colgan JP, et al. Elevated serum free light chains are associated with event-free and overall survival in two independent cohorts of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2011 Apr 20;29(12):1620–6.
 150. Barrington SF, Mikhaeel NG, Kostakoglu L, Meignan M, Hutchings M, Müller SP, et al. Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: consensus of

- the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol*. 2014 Sep 20;32(27):3048–58.
151. Horn H, Staiger AM, Vöhringer M, Hay U, Campo E, Rosenwald A, et al. Diffuse large b-cell lymphomas of immunoblastic type are a major reservoir for MYC-IGH translocations. *Am J Surg Pathol*. 2015 Jan;39(1):61–6.
 152. Bachy E, Salles G. Treatment Approach to Newly Diagnosed Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Semin Hematol*. 2015 Apr;52(2):107–18.
 153. Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006 Feb 20;24(6):995–1007.
 154. Chuang WY, Chang H, Shih LY, Wang PN, Chang YS, Lin TL, et al. CD5 positivity is an independent adverse prognostic factor in elderly patients with diffuse large B cell lymphoma. *Virchows Arch*. 2015 Nov 14;467(5):571–82.
 155. Niitsu N, Okamoto M, Tamaru JI, Yoshino T, Nakamura N, Nakamura S, et al. Clinicopathologic characteristics and treatment outcome of the addition of rituximab to chemotherapy for CD5-positive in comparison with CD5-negative diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Oncol*. 2010 Oct 1;21(10):2069–74.
 156. Ennishi D, Takeuchi K, Yokoyama M, Asai H, Mishima Y, Terui Y, et al. CD5 expression is potentially predictive of poor outcome among biomarkers in patients with diffuse large B-cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP therapy. *Ann Oncol*. 2008 Nov 18;19(11):1921–6.
 157. Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, Emile JF, Lederlin P, Sebban C, et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2-associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood*. 2003 Jun 1;101(11):4279–84.
 158. Winter JN, Weller EA, Horning SJ, Krajewska M, Variakojis D, Habermann TM, et al. Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: A prospective correlative study. *Blood*. 2006 Jun 1;107(11):4207–13.
 159. Jo Molina T, Canioni D, Copie-Bergman C, Recher C, Brière J, Haioun C, et al. Young patients with non-germinal center B-cell - like diffuse large B-cell lymphoma benefit from intensified chemotherapy with ACVBP plus rituximab compared with CHOP plus rituximab: Analysis of data from the Groupe d'Etudes des Lymphomes de

- l'Adulte/Lymp. *J Clin Oncol*. 2014 Dec 10;32(35):3996–4003.
160. Sarkozy C, Traverse-Glehen A, Coiffier B. Double-hit and double-protein-expression lymphomas: Aggressive and refractory lymphomas. *Lancet Oncol*. 2015 Nov;16(15):e555–67.
 161. Savage KJ, Slack GW, Mottok A, Sehn LH, Villa D, Kansara R, et al. Impact of dual expression of MYC and BCL2 by immunohistochemistry on the risk of CNS relapse in DLBCL. *Blood*. 2016 May 5;127(18):2182–8.
 162. Hao X, Wei X, Huang F, Wei Y, Zeng H, Xu L, et al. The expression of CD30 based on immunohistochemistry predicts inferior outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Batra SK, editor. PLoS One*. 2015 May 14;10(5):e0126615.
 163. Tzankov A, Xu-Monette ZY, Gerhard M, Visco C, Dirnhofer S, Gisin N, et al. Rearrangements of MYC gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Mod Pathol*. 2014 Jul 13;27(7):958–71.
 164. Iqbal J, Meyer PN, Smith LM, Johnson NA, Vose JM, Greiner TC, et al. BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clin Cancer Res*. 2011 Dec 15;17(24):7785–95.
 165. Shustik J, Han G, Farinha P, Johnson NA, Neriah S Ben, Connors JM, et al. Correlations between BCL6 rearrangement and outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP or R-CHOP. *Haematologica*. 2010 Jan 1;95(1):96–101.
 166. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, Connors JM, Sehn LH, Farinha P, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood*. 2009 Oct 22;114(17):3533–7.
 167. Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, Van Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Boerma EJ, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*. 2011 Feb 24;117(8):2319–31.
 168. Li S, Desai P, Lin P, Yin CC, Tang G, Wang XJ, et al. MYC/BCL6 double-hit lymphoma (DHL): A tumour associated with an aggressive clinical course and poor prognosis. *Histopathology*. 2016 Jun;68(7):1090–8.

169. Pileri SA, Pulford K, Mori S, Mason DY, Sabattini E, Roncador G, et al. Frequent expression of the NPM-ALK chimeric fusion protein in anaplastic large-cell lymphoma, lympho-histiocytic type. *Am J Pathol.* 1997 Apr;150(4):1207–11.
170. Xu-Monette ZY, Dabaja BS, Wang X, Tu M, Manyam GC, Tzankov A, et al. Clinical features, tumor biology, and prognosis associated with MYC rearrangement and Myc overexpression in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Mod Pathol.* 2015 Dec 6;28(12):1555–73.
171. Trinh DL, Scott DW, Morin RD, Mendez-Lago M, An J, Jones SJM, et al. Analysis of FOXO1 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2013 May 2;121(18):3666–74.
172. Intlekofer AM, Younes A. Precision therapy for lymphoma—current state and future directions. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014 Oct 19;11(10):585–96.
173. Alizadeh AA, Gentles AJ, Alencar AJ, Liu CL, Kohrt HE, Houot R, et al. Prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of 2 genes reflecting tumor and microenvironment. *Blood.* 2011 Aug 4;118(5):1350–8.
174. Challa-Malladi M, Lieu YK, Califano O, Holmes AB, Bhagat G, Murty V V., et al. Combined Genetic Inactivation of β 2-Microglobulin and CD58 Reveals Frequent Escape from Immune Recognition in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell.* 2011 Dec 13;20(6):728–40.
175. Rimsza LM, Roberts RA, Miller TP, Unger JM, LeBlanc M, Braziel RM, et al. Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: A follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular. *Blood.* 2004 Jun 1;103(11):4251–8.
176. Alencar AJ, Malumbres R, Kozloski GA, Advani R, Talreja N, Chinichian S, et al. MicroRNAs are independent predictors of outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Clin Cancer Res.* 2011 Jun 15;17(12):4125–35.
177. Lim EL, Trinh DL, Scott DW, Chu A, Krzywinski M, Zhao Y, et al. Comprehensive miRNA sequence analysis reveals survival differences in diffuse large B-cell lymphoma patients. *Genome Biol.* 2015 Jan 29;16(1):18.
178. Ghesquieres H, Slager SL, Jardin F, Veron AS, Asmann YW, Maurer MJ, et al.

- Genome-Wide association study of event-free survival in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *J Clin Oncol*. 2015 Nov 20;33(33):3930–7.
179. Quintanilla-Martinez L, Preffer F, Rubin D, Ferry JA, Harris NL. CD20+ T-cell lymphoma: Neoplastic transformation of a normal T-cell subset. *Am J Clin Pathol*. 1994 Oct 1;102(4):483–9.
 180. Dabbs, David J. M. *Diagnostic Immunohistochemistry, Theranostic and genomic applications*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier; 2018.
 181. Yang LH, Ingersoll K, Zhao Y, Luedke C, Sebastian S, Wang E. CD3-positive diffuse large B-cell lymphoma relapses as CD3-negative large B-cell lymphoma: Loss of aberrant antigen expression in B-cell lymphoma after chemotherapy. *Pathol Res Pract*. 2018 Oct 1;214(10):1738–44.
 182. Haberl S, Haferlach T, Stengel A, Jeromin S, Kern W, Haferlach C. MYC rearranged B-cell neoplasms: Impact of genetics on classification. *Cancer Genet*. 2016 Oct 1;209(10):431–9.
 183. Fowler NH, Cheah CY, Gascoyne RD, Gribben J, Neelapu SS, Ghia P, et al. Role of the tumor microenvironment in mature B-cell lymphoid malignancies. 2016;
 184. Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: Friends or foes? *Lab Investig*. 2006;86(3):231–45.
 185. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 30;441(7090):235–8.
 186. Sharabi A, Tsokos MG, Ding Y, Malek TR, Klatzmann D, Tsokos GC. Regulatory T cells in the treatment of disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17(11):823–44.
 187. Zhao H, Liao X, Kang Y. Tregs: Where we are and what comes next? *Front Immunol*. 2017;8(Nov 24):1578.
 188. Nam SJ, Kim S, Kwon D, Kim H, Kim S, Lee E, et al. Prognostic implications of tumor-infiltrating macrophages, M2 macrophages, regulatory T-cells, and indoleamine 2,3-dioxygenase-positive cells in primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *Oncoimmunology*. 2018;7(7):e1442164.

189. Coffelt SB, Hughes R, Lewis CE. Tumor-associated macrophages: Effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2009 Aug;1796(1):11–8.
190. McCord R, Bolen CR, Koeppen H, Kadel EE, Oestergaard MZ, Nielsen T, et al. PD-L1 and tumor-associated macrophages in de novo DLBCL. *Blood Adv*. 2019 Feb 26;3(4):531–40.
191. Gravelle P, Burrioni B, Péricart S, Rossi C, Bezombes C, Tosolini M, et al. Mechanisms of PD-1/PD-L1 expression and prognostic relevance in non-Hodgkin lymphoma: a summary of immunohistochemical studies. *Oncotarget*. 2017 Jul 4;8(27):44960–75.
192. Song M-K, Park B-B, Uhm J. Understanding Immune Evasion and Therapeutic Targeting Associated with PD-1/PD-L1 Pathway in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 15;20(6):1326.
193. Merryman RW, Armand P, Wright KT, Rodig SJ. Checkpoint blockade in Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma. *Blood Adv*. 2017;1(26):2643–54.
194. Kwon D, Kim S, Kim P-JJ, Go H, Nam SJ, Paik JH, et al. Clinicopathological analysis of programmed cell death 1 and programmed cell death ligand 1 expression in the tumour microenvironments of diffuse large B cell lymphomas. *Histopathology*. 2016 Jun 1;68(7):1079–89.
195. Horvat M, Zadnik V, Južnič Šetina T, Boltežar L, Pahole Goličnik J, Novaković S, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: 10 years' real-world clinical experience with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisolone. *Oncol Lett*. 2018 Mar 11;15(3):3602–9.
196. 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. *Br J Haematol*. 2001 Mar;112(4):945–9.
197. Leivonen SK, Pollari M, Brück O, Pellinen T, Autio M, Karjalainen-Lindsberg ML, et al. T-cell inflamed tumor microenvironment predicts favorable prognosis in primary testicular lymphoma. *Haematologica*. 2019 Feb;104(2):338–46.
198. Georgiou K, Meng B, Nordenskjold M, Wang X, Berglund M, Bhagat G, et al. Genetic

- basis of PD-L1 overexpression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2016;127(24):3026–34.
199. Rossille D, Gressier M, Damotte D, Maucort-Boulch D, Pangault C, Semana G, et al. High level of soluble programmed cell death ligand 1 in blood impacts overall survival in aggressive diffuse large B-Cell lymphoma: results from a French multicenter clinical trial. *Leukemia*. 2014 Dec 15;28(12):2367–75.
 200. Hu L-Y, Xu X-L, Rao H-L, Chen J, Lai R-C, Huang H-Q, et al. Expression and clinical value of programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) in diffuse large B cell lymphoma: a retrospective study. *Chin J Cancer*. 2017;36(1):1–11.
 201. Riihijärvi S, Fiskvik I, Taskinen M, Vajavaara H, Tikkala M, Yri O, et al. Prognostic influence of macrophages in patients with diffuse large B-Cell lymphoma: A correlative study from a nordic phase II trial. *Haematologica*. 2015 Feb;100(2):238–45.
 202. Lee N-R, Song E-K, Jang KY, Choi HN, Moon WS, Kwon K, et al. Prognostic impact of tumor infiltrating FOXP3 positive regulatory T cells in diffuse large B-cell lymphoma at diagnosis. *Leuk Lymphoma*. 2008 Jan;49(2):247–56.
 203. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dirnhofer S. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2008 Feb 1;93(2):193–200.
 204. Ahearne MJ, Bhuller K, Hew R, Ibrahim H, Naresh K, Wagner SD. Expression of PD-1 (CD279) and FoxP3 in diffuse large B-cell lymphoma. *Virchows Arch*. 2014 Sep 11;465(3):351–8.
 205. Ma G-F, Miao Q, Liu Y-M, Gao H, Lian J-J, Wang Y-N, et al. High FoxP3 expression in tumour cells predicts better survival in gastric cancer and its role in tumour microenvironment. *Br J Cancer*. 2014 Mar 18;110(6):1552–60.
 206. Ebert LM, Tan BS, Browning J, Svobodova S, Russell SE, Kirkpatrick N, et al. The regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells. *Cancer Res*. 2008 Apr 15;68(8):3001–9.
 207. Winerdal ME, Marits P, Winerdal M, Hasan M, Rosenblatt R, Tolf A, et al. FOXP3 and survival in urinary bladder cancer. *BJU Int*. 2011 Nov;108(10):1672–8.
 208. Wang W-H, Jiang C-L, Yan W, Zhang Y-H, Yang J-T, Zhang C, et al. FOXP3

- expression and clinical characteristics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2010 Nov 21;16(43):5502.
209. Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg H-H, Ammerpohl O, Grüssel S, Sipos B, et al. Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res.* 2007 Sep 1;67(17):8344–50.
 210. Ladoire S, Arnould L, Mignot G, Coudert B, Rébé C, Chalmin F, et al. Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Jan 13;125(1):65–72.
 211. Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, Malventano C, Triulzi T, Mènard S, et al. FOXP3 Expression and Overall Survival in Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Apr 10;27(11):1746–52.
 212. Tao H, Mimura Y, Aoe K, Kobayashi S, Yamamoto H, Matsuda E, et al. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer.* 2012 Jan;75(1):95–101.
 213. Kim M, Grimmig T, Grimm M, Lazariotou M, Meier E, Rosenwald A, et al. Expression of Foxp3 in colorectal cancer but not in Treg cells correlates with disease progression in patients with colorectal cancer. Li J, editor. *PLoS One.* 2013 Jan 30;8(1):e53630.
 214. Vadasz Z, Toubi E. FoxP3 Expression in Macrophages, Cancer, and B Cells—Is It Real? *Clin Rev Allergy Immunol.* 2017 Jun 24;52(3):364–72.
 215. Felcht M, Heck M, Weiss C, Becker JC, Dippel E, Müller CSL, et al. Expression of the T-cell regulatory marker FOXP3 in primary cutaneous large B-cell lymphoma tumour cells. *Br J Dermatol.* 2012 Aug;167(2):348–58.
 216. Juárez-Salcedo LM, Sandoval-Sus J, Sokol L, Chavez JC, Dalia S. The role of anti-PD-1 and anti-PD-L1 agents in the treatment of diffuse large B-cell lymphoma: The future is now. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017;113:52–62.

8. EKLER

8.1 ETİK KURUL ONAY BELGESİ



EGE ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
 Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
 Tel : 0 232 390 2134 e-mail: tibbietik@yahoo.com.
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Primer Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Olgularında PD-1/PD-L1 Ekspresyonunun, tümör Mikroçevresinin ve Prognostik Özelliklerinin Değerlendirilmesi				
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Nazan ÖZSAN				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI	Tıbbi Patoloji				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı				
	DESTEKLEYİCİ	Bilimsel Araştırmalar Projesi				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. kaynaklardan destek alanlar için)	-				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-				
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi				
	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	-				
	BİLGİLENDİRME FORMU	-				
	VERİ İZLEME FORMU/ ANKET	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>				
	DİĞER	<input type="checkbox"/>				
KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 19-2.1T/29	Tarih: 20.02.2019				
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğuna toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					
EGE ÜNİVERSİTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
ÇALIŞMA ESASI	Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU					
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU Başkan	Halk Sağlığı AD.	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Şafak DAĞHAN Başkan Yardımcısı	Halk Sağlığı Hemşireliği AD.	Ege Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Sadık AKŞİT Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları AD	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	

EGE ÜNİVERSİTESİ
 TIBBİ ARAŞTIRMALAR
 ETİK KURULU
 BAŞKANIN İZİNİ

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU	İMZA	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi		Sayfa
				1/2



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
Tel: 0 232 390 2134 e-mail: tibbietik@yahoo.com.
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Primer Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Olgularında PD-1/PD-L1 Ekspresyonunun, tümör Mikroçevresinin ve Prognostik Özelliklerinin Değerlendirilmesi
ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	

KARAR BİLGİLERİ		Karar Nu: 19-2.1T/29				
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ayhan DÖNMEZ Üye	İç Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Murat ULUKUŞ Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Ceyda KABAROĞLU Üye	Klinik Biyokimya BD.	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD. Klinik Biyokimya BD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Özen Önen SERTÖZ Raportör Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Günay YETİK ANACAK Üye	Farmakoloji	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. H. Oya TÜRKOĞLU ÇAKAL Üye	Periodontoloji	Ege Üniversitesi Diş Hek. Fakültesi Periodontoloji AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Recı MESERİ Üye	Beslenme ve Diyetetik AD	Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Tahir ATİK Üye	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları AD Çocuk Genetik BD.	E	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	

* Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

ASLI GİBİDİR
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU REVERTE

8.2 BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Araştırmanın adı: Primer Diffüz büyük B hücreli lenfoma olgularında PD-1/ PD-L1 ekspresyonun ve tümör mikroçevresinin ve prognostik özelliklerinin değerlendirilmesi

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (FORM 17)

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar

ÇALIŞMANIN AMACI NEDİR?

Kötü huylu lenfoid doku tümörü olan diffüz büyük B hücreli lenfomalar mikroskopik görüntüleri çok benzemekle birlikte klinik gidişatı hastalar arasında oldukça farklılık göstermektedir. Bu farklılığın sebeplerini ortaya koymak ve hedefe yönelik tedavi seçenekleri açısından çalışmamızda PD-1, PD-L1, CD4, CD8, CD68, CD163 ve FOXP3 olarak adlandırılan immunhistokimyasal belirteçlerin patolojik verilerle ilişkisi araştırılacaktır.

KATILMA KOŞULLARI NEDİR?

Tıbbi patoloji raporlarında ‘diffüz büyük B hücreli lenfoma’ tanısı almış olmanız, tümörünüze ait parafin bloklarının EÜTF Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı’nda incelenmiş, blokların halen arşivde bulunması ve yeterli tümöral doku içermesi

NASIL BİR UYGULAMA YAPILACAKTIR?

Çalışma için size ek bir işlem yapılmayacaktır. Tüm incelemeler sizden daha önce alınmış olan doku örneğinin parafin bloğunda gerçekleştirilecektir.

SORUMLULUKLARIM NEDİR?

Araştırma ile ilgili olarak rutin kontrollerinizi hastanemizde yaptırmanız ve sonuçları dosyanıza işletmeniz sizin sorumluluklarınızdır. Bu koşullara uymadığınız durumlarda araştırmacı sizi uygulama dışı bırakabilme yetkisine sahiptir.

KATILIMCI SAYISI NEDİR?

Araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı 180’dir.

KATILIMIM NE KADAR SÜRECEKTİR?

Bu araştırmada yer almanız için öngörülen süre 18 aydır.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI YARAR NEDİR?

Bu araştırmada sizin için herhangi bir zarar yok olup, bu çalışmadan çıkarılan sonuçlarla size ve sizin hastalığınıza sahip kişilere nasıl yaklaşacağımıza, hangi tedaviyi izleyeceğimize ve hastalığının seyri konusunda bir öngörüle bulunmamıza yardımcı olabileceksiniz. Ancak siz doğrudan yarar görmeyebilirsiniz ya da tedavinizin seyrini değiştirebilirsiniz.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI RİSKLER NEDİR?

Çalışmamızda arşivde yer alan materyaliniz kullanılacağı için sizler açısından beklenen olası bir risk bulunmamaktadır.

HANGİ KOŞULLARDA ARAŞTIRMA DIŞI BIRAKILABİLİRİM?

Araştırılacak doku örneğinizin teknik olarak çalışmaya uygun olmaması durumunda sizin izniniz olmadan da sizi çalışmadan çıkarabiliriz.

DİĞER TEDAVİLER NELERDİR?

Bu çalışmada sadece araştırma yapılmaktadır. Bu çalışmaya alınmanıza neden olan hastalığınızla ilgili bu çalışma kapsamında başka bir tedavi yapılmayacaktır.

HERHANGİ BİR ZARARLANMA DURUMUNDA YÜKÜMLÜLÜK/SORUMLULUK KİMDEDİR VE NE YAPILACAKTIR?

Araştırmaya bağlı bir zarar söz konusu değildir. Tüm işlemler sizden daha önce alınmış olan doku örneğinden hazırlanmış parafin blok üzerinde yapılacaktır.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLAR İÇİN KİMİ ARAMALIYIM?

Bu çalışma ile ilgili bir sorun yaşamayacaksınız. Ancak yine de herhangi bir soru ya da düşünceniz olursa 05054525385 ya da 0232 3903709 no'lu telefonlardan Doç.Dr. Nazan Özsan ile görüşebilirsiniz.

Araştırmanın adı: Primer Diffüz büyük B hücreli lenfoma olgularında PD-1/ PD-L1 ekspresyonun ve tümör mikroçevresinin ve prognostik özelliklerinin değerlendirilmesi

ÇALIŞMA KAPSAMINDAKİ GİDERLER KARŞILANACAK MIDIR?

Yapılacak her tür inceleme ve diğer araştırma masrafları araştırma ekibi tarafından karşılanacak olup size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

ÇALIŞMAYI DESTEKLEYEN KURUM VAR MIDIR?

Çalışmayı destekleyen kurum Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinatörlüğü'dür.

ÇALIŞMAYA KATILMAM NEDENİYLE HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILACAK MIDIR?

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır.

ARAŞTIRMAYA KATILMAYI KABUL ETMEMEM VEYA ARAŞTIRMADAN AYRILMAM DURUMUNDA NE YAPMAM GEREKİR?

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; bu size yapılacak işlemleri etkilemeyecektir. Araştırmacı, doku örneğinizin teknik olarak çalışmaya uygun olmaması durumunda isteğiniz dışında sizi araştırmadan çıkarabilir. Bu durumda hastalığınıza ilişkin diğer tedavi ve rutin kontrolleriniz etkilenmeyecektir.

Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

KATILMAMA İLİŞKİN BİLGİLER KONUSUNDA GİZLİLİK SAĞLANABİLECEK MIDİR?

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren iki (2) sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

ARAŞTIRMA EKİBİNDE YER ALAN VE YETKİN BİR ARAŞTIRMACININ		İMZASI
ADI & SOYADI	Doç. Dr. Nazan özsan	
TARİH		

GEREKTIĞİ DURUMLARDA TANIK		İMZASI
ADI & SOYADI		
GÖREVİ		
TARİH		

8.3 OLGU RAPOR FORMU ÖRNEĞİ

OLGU RAPOR FORMU ÖRNEĞİ

Tarih:

Çalışma Adı/Kodu: Primer Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Olgularında PD-1/PD-L1 Ekspresyonunun, Tümör Mikroçevresinin Ve Prognostik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Olgu numarası:

- **Biyopsi No:**
- **Telefon/Adres:**
- **Yaş:**
- **Cinsiyet:**
- **Tanı:**
- **Tümör lokalizasyonu:**
- **Hans algoritmasına göre fenotipi:**
- **kemik iliği tutulumu:**
- **Ann Arbor evresi :**
- **Hastahksız sağ kalım süresi:**
- **Toplam sağ kalım süresi:**
- **Eşlik eden hastalıklar:**
- **Aldığı tedavi:**
- **Tümör mikroçevresinde yer alan hücreler ve morfolojik/immunhihtokimyasal özellikleri:**
- **İmmunohistokimyasal Yöntem ile:**
 - **PD-L1 boyanması:**
 - **PD-1 boyanması:**
 - **FOXP3 boyanması:**
 - **CD4 boyanması:**
 - **CD8 boyanması:**

- **CD68 boyanması:**
- **CD163 boyanması:**
- **Diğer:**
- **Notlar :**

Doç. Dr. Nazan Özsan
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı



8.4 TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

PRİMER DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMA OLGULARINDA PD-1/ PD-L1 EKSPRESYONUNUN, TÜRÖR MİKROÇEVRESİNİN VE PROGNOSTİK ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%6 BENZERLİK ENDEKSİ	%4 İNTERNET KAYNAKLARI	%3 YAYINLAR	%4 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	halksagligiokulu.org İnternet Kaynağı	%1
2	adusaglikbilimlerikongresi.com İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
4	tahek.esfam.org İnternet Kaynağı	<%1
5	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<%1
7	www.kbb.org.tr İnternet Kaynağı	<%1

8	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<% 1
9	Senem Karabulut, Mehmet Karabulut, Halil Alış, Nergiz Dağoğlu et al. "The predictive and prognostic value evaluation of serum extracellular matrix proteins levels in patients with pancreas adenocarcinoma", Bakirkoy Tıp Dergisi / Medical Journal of Bakirkoy, 2016 Yayın	<% 1
10	Submitted to Okan Āniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
11	www.turkiyeklinikleri.com İnternet Kaynağı	<% 1
12	www.creativebiomart.net İnternet Kaynağı	<% 1
13	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
14	angora.baskent.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
15	ŞENTÜRK GÜVEN, Şeyma, ÖZCAN, Didem Sezgin, ARAS, Meltem, KÖSEOĞLU, Belma Füsün and AK, Fikri. "Multipl sklerozlu hastalarda ağrının değerlendirilmesi ve yaşam kalitesi, yorgunluk ve depresyon ile ilişkisi", Türkiye Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Derneği,	<% 1

2016.

Yayın

16	jitc.biomedcentral.com İnternet Kaynağı	<% 1
17	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
18	Submitted to Trinity College Dublin Öğrenci Ödevi	<% 1
19	www.ankilozanspondilit.com İnternet Kaynağı	<% 1
20	infeksiyon.dergisi.org İnternet Kaynağı	<% 1
21	Submitted to Izmir Katip Āelebi Āniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
22	www.guidetoimmunopharmacology.org İnternet Kaynağı	<% 1
23	www.jimmunol.org İnternet Kaynağı	<% 1
24	www.biogen.com.tr İnternet Kaynağı	<% 1
25	journals.sagepub.com İnternet Kaynağı	<% 1
26	Guinee, D.G.. "Update on pulmonary and pleural lymphoproliferative disorders",	<% 1

Diagnostic Histopathology, 200810

Yayın

27	chemlife.com.tr İnternet Kaynağı	<% 1
28	kongre5.saykad.net İnternet Kaynağı	<% 1
29	halkhemderkongre2018.org İnternet Kaynağı	<% 1
30	www.phdernegi.org İnternet Kaynağı	<% 1
31	aydinichastaliklarigunleri.com İnternet Kaynağı	<% 1
32	Cornelia Ringer, Sarah Tune, Mirjam A Bertoune, Hans Schwarzbach, Kazutake Tsujikawa, Eberhard Weihe, Burkhard Schütz. "Disruption of calcitonin gene-related peptide signaling accelerates muscle denervation and dampens cytotoxic neuroinflammation in SOD1 mutant mice", Cellular and Molecular Life Sciences, 2016 Yayın	<% 1
33	www.clinicaoncologieseveren.ro İnternet Kaynağı	<% 1
34	www.eurasianbiochem.org İnternet Kaynağı	<% 1

35	www.sciedu.ca İnternet Kaynağı	<% 1
36	ÇELİK, Serdar, ALTUN, Zekiye Sultan and AKTAŞ, Safiye. "Mesane Kanserinde Yeni İmmünoterapötik Ajanlardan Kontrol Noktası İnhibitörlerinin (CTLA-4, PD-1 ve PD-L1 İnhibitörleri) Etkileri ve Mekanizmaları", Galenos Yayınevi, 2018. Yayın	<% 1
37	Coffelt, S.B.. "Tumor-associated macrophages: Effectors of angiogenesis and tumor progression", BBA - Reviews on Cancer, 200908 Yayın	<% 1
38	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
39	KUBALOĞLU, Anıl, YILMAZ, Yasin and ÖZERTÜRK, Yusuf. "Penetran keratoplasti sonrası glokom tedavisinde mitomisin C ile uygulanan trabekülektomi", MEBAS Medikal Basın, 2004. Yayın	<% 1