



T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

**ANKARA DR. ABDURRAHMAN YURTASLAN ONKOLOJİ SAĞLIK UYGULAMA VE
ARAŞTIRMA MERKEZİ
TIBBİ PATOLOJİ KLİNİĞİ**

**DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMA OLGULARINDA
LENFOSİT AKTİVASYON GENİ-3 (LAG-3) EKSPRESYONUNUN
HİSTOPATOLOJİK VE PROGNOSTİK BELİRTEÇLER İLE
İLİŞKİSİ**

Dr. Emine Begüm Coşkun

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA/2020



T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

**ANKARA DR. ABDURRAHMAN YURTASLAN ONKOLOJİ SAĞLIK UYGULAMA VE
ARAŞTIRMA MERKEZİ
TIBBİ PATOLOJİ KLİNİĞİ**

**DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMA OLGULARINDA
LENFOSİT AKTİVASYON GENİ-3 (LAG-3) EKSPRESYONUNUN
HİSTOPATOLOJİK VE PROGNOSTİK BELİRTEÇLER İLE
İLİŞKİSİ**

Dr. Emine Begüm Coşkun

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Olçay Kandemir
Yardımcı tez danışmanı: Dr. Mehmet Doğan
(TIPTA UZMANLIK TEZİ)**

ANKARA/2020

TEŞEKKÜR

Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim esnasında bilgi ve tecrübelerinden çok yararlandığım, eğitimim sırasında bana destek olan ve aynı zamanda da tez danışmanım olan Prof. Dr. Olcay KANDEMİR hocama; kendisinden çok şey öğrendiğim ve çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan, iş yoğunluğuna rağmen benden desteğini esirgemeyen, yardımcı tez danışmanım Uzm. Dr. Mehmet DOĞAN'a ve uzmanlık eğitimim boyunca üzerimde emeği bulunan bölümümüzün diğer tüm uzmanlarına teşekkürlerimi arz ederim.

Anlayışları ve destekleri ile her zaman yanımda olan, her zaman güvenebileceğimi hissettiğim, aynı ekipte çalışmaktan mutluluk duyduğum, Dr. Müzeyyen Burcu KAPLAN YILMAZ, Dr. Esin ERGÜN, Dr. Berna KARABULUT, Dr. Çiğdem YILDIRIM ve Dr. Ayşe GEZER ve bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren tüm kıdemli asistan arkadaşlarıma gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın arşiv, kesit ve immünohistokimya çalışmalarında emeği geçen laboratuvar çalışanlarımız ve arşiv sorumlumuza ayrıca teşekkür ederim.

Sağlık Bilimleri Üniversitesi BAP Birimi tarafından desteklenen çalışmam için çalışmanın yürütülmesinde destek sağlayan tüm SBÜ BAP Koordinatörlüğü üyelerine teşekkür ederim.

Yoğun çalışma tempoma büyük anlayış gösteren ve bana her konuda destek olan eşim Dr. Ali COŞKUN'a, hekimlik mesleği başta olmak üzere, hayatımın tüm yönlerinde bana yol gösteren babam Dr. Lütfi ÖZYÜREK'e, sevgisi ve desteğini her zaman arkamda hissettiğim annem Gönül ÖZYÜREK ve ablam Hande AKYOL'a ve kalbinde yer ettiğim, burada adını sayamadığım herkese teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Emine Begüm COŞKUN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
KISALTMALAR.....	iii
TABLO LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	xi
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
MATERYAL VE METOD	23
BULGULAR.....	31
TARTIŞMA	47
SONUÇLAR	57
KAYNAKLAR	59
EK-1 (ÖZGEÇMİŞ	71
EK-2 (TEZ KONUSU ONAY FORMU	73
EK-3 (ETİK KURUL ONAY BELGESİ.....	77
EK-4 (TURNİTİN ORJİNALLİK RAPORU	79

KISALTMALAR

APC	: Antijen Sunan Hücre
Breg	: Düzenleyici B hücresi
CTGF	: Cytokine growth factor
CTLA-4	: Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Antijen-4
DBBHL	: Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EBV	: Epstein Barr Virus
ECOG	: Eastern Cooperative Oncology Group
FISH	: Fluoresan in situ hibridizasyon
FOXP3	: Forkhead box P3
GM	: Germinal Merkez
H&E	: Hematoksilen&Eozin
HHV8	: Human Herpes Virus 8
HIV	: İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
IFN	: Interferon
Ig	: İmmünglobulin
IL	: İnterlökin
IPI	: Uluslararası Prognostik İndeks
İHK	: İmmünohistokimya
KGH	: Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon
LAG-3	: Lenfosit Aktivasyon Geni-3
LDH	: Laktat dehidrojenaz
MDSC	: Myeloid derive süpresör hücreler
MHC	: Major Doku Uyumluluk Kompleksi
NCCN	: National Cancer Center Network
NHL	: Non-Hodgkin Lenfoma
NK	: Doğal öldürücü
NOS	: Başka türlü spesifiye edilemeyen
PD-1	: Programlı Hücre Ölümü Proteini
PD-L	: Programlı Hücre Ölümü Proteini Ligandı

PDF Eraser Free

R-CHOP : Siklofosfamid, doksorubisin, vinkristin, prednizon+ritüksimab

TCR : T hücre reseptörü

TGF : Dönüştürücü büyüme faktörü

Th : Yardımcı T hücresi

TILs : Tümörü İnfiltrate Eden Lenfositler

TIM-3 : T hücre immünoglobulin müsin-3

TNF : Tümör Nekroz Faktörü

Treg : Düzenleyici T hücre

YNGS : Yeni Nesil Gen Sekanslama



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: DBBHL sınıflamasında 2017 DSÖ güncellemesi: alt tipler ve ilişkili antiteler	4
Tablo 2: DBBHL’lerde sıklıkla eksprese edilen antijenler	10
Tablo 3: NCCN (National Cancer Center Network) IPI (International Prognostic Index).....	15
Tablo 4: LAG-3 ve Tümör infiltrate eden lenfositlerin (TIL) ilişkisi (LSECTin: “Liver sinusoidal endothelial cell lectin	22
Tablo 5: İHK boyamada otomatik cihaz öncesi basamaklar.....	24
Tablo 6: İHK boyamada otomatik cihaz içi basamaklar	24
Tablo 7: Çalışmaya dahil edilen olguların demografik ve klinik özellikleri.....	33
Tablo 8: Çalışmaya dahil edilen olguların patolojik özellikleri.....	34
Tablo 9: LAG-3 TIL, LAG-3 tümör hücresi-yüzde ve LAG-3 tümör hücresi-şiddet düzeyleri ile yaş, Ann Arbor evresi, IPI skoru ve Ki-67 boyanma yüzdesi arasındaki korelasyon katsayıları ve önemlilik düzeyleri.....	35
Tablo 10: Olguların diğer demografik ve klinik özelliklerine göre LAG-3 TILs, LAG-3 tümör-yüzde ve LAG-3 tümör-şiddet düzeyleri	37
Tablo 11: Genel sağkalım üzerinde LAG-3 TILs, tümördeki LAG-3 yüzdesi ve şiddetinin etkilerinin tek değişkenli Cox’un oransal hazard regresyon yöntemi ile incelenmesi.....	38
Tablo 12: LAG-3 TIL düzeylerine göre olguların demografik ve klinik özellikleri.	39
Tablo 13: LAG-3 tümör yüzdesi düzeylerine göre olguların demografik ve klinik özellikleri	40
Tablo 14: LAG-3 tümör şiddeti derecesine göre olguların demografik ve klinik özellikleri	42

Tablo 15: Genel sağ kalım üzerinde LAG-3 TILs, LAG-3 tümör yüzdesi ve LAG-3 tümör şiddetinin etkilerinin incelenmesi..... 43

Tablo 16: LAG-3 pozitif TILs'ın sayısı ve LAG-3'ün tümör hücrelerindeki ekspresyon şiddetinin çapraz olarak değerlendirilmesi..... 48



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1: DBBHL olgusunda tümör hücrelerinin diffüz paternde dizilimi ve arada ince fibröz bantlar (Hematoksilen&Eozin, X200	7
Şekil 2: DBBHL olgusunda, tümör hücre apoptozuna bağlı apoptotik cisimcikler (Hematoksilen&Eozin, X1000	7
Şekil 3: Sentroblastik varyant DBBHL olgusunda, sentroblastik hücreler (sarı oklar) (Hematoksilen&Eozin, X1000	8
Şekil 4: DBBHL, anaplastik varyant (Hematoksilen&Eozin, X1000	9
Şekil 5: Hans algoritması.....	12
Şekil 6: Tümör mikroçevresinde bulunan iltihabi hücreler ve tümör hücrelerinin bağışıklık yanıtı ile etkileşimi	16
Şekil 7: Tümör mikroçevresinde, antijen sunan hücreler	19
Şekil 8: LAG-3 (Lenfosit Aktivasyon Geni-3) yapısı	20
Şekil 9: DBBHL olgusuna ait Hematoksilen&Eozin boyalı kesit(A) ve LAG-3 immünohistokimyasal çalışması uygulanmış kesit(B) (200x	26
Şekil 10: LAG-3 immünohistokimyası uygulanmış DBBHL dokusu. Tümör hücrelerinde ve TIL'lerde golgi paterninde ekspresyon(1000x)	27
Şekil 11-A: DBBHL hücrelerinde yaygın ve şiddetli LAG-3 ekspresyonu (400x....	27
Şekil 11B: DBBHL hücrelerinde yaygın ve şiddetli LAG-3 ekspresyonu (1000x ..	28
Şekil 12: DBBHL olgusunda tümör hücrelerinde seyrek ve zayıf LAG-3 ekspresyonu (X1000	28
Şekil 13: LAG-3 TIL sayı aralıklarındaki olgu sayısının dağılımı	31
Şekil 14: Tümördeki LAG-3 boyanma yüzde aralıklarına göre vakaların dağılımı..	32

Şekil 15: Tümöral dokudaki LAG-3 ekspresyonunun şiddetine göre vakaların dağılımı	32
Şekil 16: Genel sağ kalım yüzdesi ile takip süresi korelasyonu	44
Şekil 17: Tümör hücrelerinde LAG-3 ekspresyonu gösteren olgular ile negatif izlenen olguların sağ kalım grafiği	45
Şekil 18: Tümör hücrelerinde LAG-3 ekspresyonu %6'nın üzerinde ve %6'nın altında olan olguların sağ kalım grafiği	45
Şekil 19: LAG-3 pozitif TILs sayısı 5'in altında ve üstünde olan olguların sağ kalımlarının karşılaştırılması	46

ÖZET

AMAÇ

Diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL), dünya çapında en sık görülen Non-Hodgkin Lenfoma(NHL) türüdür. Hastaların bir bölümü tedaviye yanıt vermemekte ya da nüksler nedeniyle kaybedilmektedir. Bundan dolayı tedaviye ve prognoza yönelik belirteçlerin araştırılması önem taşımaktadır.

Günümüzde, tümör mikroçevresinde bulunan bağışıklık hücrelerinin immün kontrol noktasındaki reseptörleri, tedavide ve prognozun belirlenmesinde umut vaad etmektedir. Bu immün kontrol noktasındaki moleküllerden birisi olan Lenfosit Aktivasyon Geni-3(LAG-3) ile ilgili birtakım yayınlar olsa da literatürdeki çalışmalar kısıtlıdır.

Bu çalışmada, DBBHL olgularında, LAG-3'ün tümör hücrelerindeki ve tümörü infiltre eden lenfositlerdeki (TILs) immünohistokimyasal ekspresyonunun, hastanın klinik ve prognostik verileri ile ilişkisi araştırıldı. Bu yolla, LAG-3 molekülünün, DBBHL hastalarındaki ekspresyon durumunun ortaya konması ve prognostik değeri olup olmadığının belirlenmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, 210 adet DBBHL olgusuna ait LAG-3 immünohistokimyasal antikorları ile işaretli kesitlerde TILs'teki ve tümör hücrelerindeki LAG-3 ekspresyonu iki patolog tarafından değerlendirildi. Vakaların yaşı, cinsiyeti, tanı anındaki hastalık evresi, IPI skoru ve R-CHOP tedavisine yanıt derecesi kaydedildi.

BULGULAR

Çalışmamızda DBBHL tanısı almış olguların %39'unun tümör hücrelerinde, çeşitli şiddetlerde LAG-3 ekspresyonu olduğunu gördük. Tümör hücrelerinde LAG-3 ekspresyonu saptamamızın yanı sıra, önemli bir bulgu olarak, erkek cinsiyette LAG-3 pozitif tümör hücrelerinin yüzdesini anlamlı ölçüde yüksek bulduk($p<0,05$). Ayrıca, LAG-3 eksprese eden TILs sayısı, bir büyük büyütme alanında 5'in üzerinde olan olgularda, tümör hücrelerindeki LAG-3 ekspresyon şiddetini de istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmış bulduk($p<0,05$). LAG-3 eksprese eden tümör hücre

yüzdesi 6'dan düşük ve yüksek olan vakalar ve LAG-3 pozitif TILs sayısı 5'in altında ve üstündeki vakalarda R-CHOP tedavisine yanıt ve genel sağkalım açısından farklılık saptamadık.

SONUÇ

Çalışmamızın sonucunda, DBBHL olgularında tümör hücrelerinin çeşitli şiddetlerde LAG-3 eksprese ettiğini, erkek cinsiyette LAG-3 eksprese eden tümör hücrelerinin anlamlı ölçüde yüksek olduğunu ve artmış LAG-3 pozitif TILs sayısına sahip olguların tümör hücrelerinde de LAG-3'ün daha şiddetli eksprese edildiğini ortaya koyduk. Tümörde ve TILs'teki LAG-3 ekspresyonunun R-CHOP tedavisine yanıtta ve genel sağkalım üzerine anlamlı bir etkisi olmadığını saptadık.

Anahtar Kelimeler: Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma(DBBHL), Lenfosit Aktivasyon Geni-3(LAG-3), Tümör İnfiltrate Eden Lenfositler(TILs)

**THE RELATIONSHIP BETWEEN LYMPHOCYTE
ACTIVATION GENE-3 EXPRESSION WITH
HISTOPATHOLOGICAL AND PROGNOSTIC MARKERS IN
DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA CASES**

ABSTRACT

AIM

Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) is the most common worldwide Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) type worldwide. Some of the patients do not respond to treatment or lost due to recurrences. Therefore, it is important to investigate the markers for treatment and prognosis.

Today, the immune checkpoint receptors of immune cells in the tumor microenvironment are promising in the treatment and determination of prognosis of various cancer types. Although there are some research related to Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3), one of the immun checkpoint receptors, studies in the literature are limited.

In this study, the relationship between immunohistochemical expression of LAG-3 in the DLBCL cells and tumor infiltrating lymphocytes (TILs) was investigated. In this way, it was aimed to determine the expression status of LAG-3 receptor in DLBCL cases and to determine whether it has a prognostic value.

MATERIALS AND METHODS

In our study, LAG-3 expression in TILs and tumor cells in sections marked with LAG-3 immunohistochemical antibodies of 210 DLBCL cases was evaluated by two pathologists. Age, gender, Ann Arbor stage at the time of diagnosis, IPI score, and degree of response to R-CHOP treatment were recorded.

RESULTS

In our study, we found that 39% of the cases diagnosed with DLBCL had LAG-3 expression in various intensities. In addition to detecting LAG-3 expression in tumor cells, as an important finding, we found a significantly higher percentage of LAG-3 positive tumor cells in the male sex ($p < 0.05$). In addition, we found statistically significant increase in LAG-3 intensity in the cases which have more than 5 TILs per high power field ($p < 0.05$). We did not find any difference in overall survival and treatment response in cases with LAG-3 expression less than or above %6 and LAG-3 positive TILs number below and above 5.

CONCLUSION

As a result of our study, we proved that tumor cells express LAG-3 at various intensities in DLBCL cases, tumor cells expressing LAG-3 in male sex are significantly higher and LAG-3 is more strongly expressed in tumor cells of patients with increased LAG-3 positive TILs. We found that LAG-3 expression in tumor and TILs had no significant effect on response to R-CHOP therapy and overall survival.

Keywords: Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL), Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3), Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs)

GİRİŞ VE AMAÇ

GİRİŞ

Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma(DBBBL), dünya çapında en sık görülen Non-Hodgkin Lenfoma(NHL) türüdür. İnsidans oranı %6.3 olup tahmini olarak her sene 25 000 yeni vaka bildirilmektedir(1). Ritüksimab ile kombine edilmiş antrasiklin bazlı kemoterapi rejimi; R-CHOP (siklofosamid, doksorubisin, vinkristin, prednizon+ritüksimab; immünoterapi) ile DBBHL hastalarının çoğunda başlangıçta kemoterapiye yanıt elde edilirken cevaplar heterojen olup hastaların bir bölümü primer yanıtsızlık, bir bölümü de nüksler nedeniyle kaybedilmektedir(2). Hastaların risk profillerini değerlendirmek için klinik parametrelerden oluşan Uluslararası Prognostik İndeks (IPI) kullanılmaktadır(3).

Ancak aynı IPI skorlarına sahip hastalar arasında da sağkalım farklılıklarının bulunması nedeniyle, DBBHL'lerin alt tiplerinin belirlenmesi ve hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi amacıyla yeni moleküllerin araştırılmasına ağırlık verilmiştir(4). Günümüzde elde edilen yeni kanıtlar, kanser progresyonu ve tedaviye yanıtta, immün mikroçevrenin önemli yer tuttuğunu ortaya koymuştur. Kanser immünoterapisinde, sitotoksik T Lenfosit İlişkili Antijen-4(CTLA-4) (İpilimumab) ve Programlı Hücre Ölümü Proteini-Programlı Hücre Ölümü Proteini Ligandı-1(PD1-PDL-1) (Pembrolizumab, Nivolumab) moleküllerinin hedeflendiği immünoterapinin dikkat çekici etkisine rağmen, farklı tümör tiplerine sahip birçok hastada tedavi başarısızlığı yaşanmaktadır. Bu da ilgi odağının alternatif inhibitör reseptörler ve süpresif mekanizmalara çevrilmesine yol açmıştır(5).

Lenfosit Aktivasyon Geni-3(LAG-3) molekülü klinik olarak hedeflenen 3. inhibitör reseptör olup; LAG-3 up-regülasyonu aşırı immün aktivasyonun engellenmesinde ve otoimmüniteden korunmada gereklidir. Ancak, tümör mikroçevresindeki devamlı antijen maruziyeti, LAG-3 ekspresyonunun sürmesine neden olmakta ve inflamatuvar hücrelerde proliferasyon ve sitokin üretiminin azalması ile karakterize, bir tür tükenme halinin ortaya çıkmasına katkıda bulunmaktadır(5). LAG-3'ün PD1 ile çarpıcı bir sinerjiye sahip olduğunun ortaya konması ve diğer inhibitör reseptörlere göre LAG-3'ün intraselüler sitoplazmik

bölümünün farklı olması, bu molekülün kendine özgü potansiyeline dikkat çekmektedir. Şu anda 4 adet LAG-3 hedefine yönelik (LAG525) klinik çalışma devam etmekte olup bu durum, LAG-3 inhibitör reseptörüne artan ilgiyi ortaya koymaktadır(5).

LAG-3 molekülü, immünglobin süper ailesinin bir üyesi olup, 503 amino asitten oluşan tip 1 transmembran proteinidir. Aktive CD4 ve CD8 T hücrelerinde, B hücrelerinde, doğal öldürücü (NK) hücrelerinde ve plazmasitoid dendritik hücrelerin yüzeyinde eksprese edilmektedir ve Class II Major Doku Uyumluluk Kompleksi(MHC) molekülüne bağlanmakta olup negatif düzenleyici rol oynayarak T hücre fonksiyonunu baskıladığı düşünülmektedir(6).

Yapılan çalışmalar, in vitro olarak LAG-3 blokajı yapıldığında CD4 T hücrelerinde artmış proliferasyon ve sitokin üretimi gösterdiğini bulmuştur. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, folliküler lenfoma ve kronik lenfositik lösemide, tümör infiltre eden lenfositlerde LAG-3 ekspresyonunun genel sağ kalım üzerine olumsuz etkisi bulunduğu ortaya konmuştur(7). Diffüz büyük B hücreli lenfomalarda ise LAG-3 ekspresyonunun immün kaçış stratejilerinden birisi olduğunu gösteren birtakım çalışmalar bulunmaktadır; ancak daha geniş araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır(8).

AMAÇ

Bu çalışmada, DBBHL olgularında, tümörde ve tümörü infiltre eden lenfositlerde, LAG-3'ün, immünohistokimyasal boyanma özelliklerinin değerlendirilmesi ve olgularda, patolojik prognostik parametreler (Germinal merkez/germinal merkez dışı fenotip, Ki-67 proliferatif aktivite indeksi, Bcl-2, C-Myc, CD5 ve CD30 ekspresyonu) ve klinik veriler (hasta yaşı, cinsiyeti, hastalığın evresi, hastaya ait Uluslararası Prognostik İndeks, R-CHOP tedavisine yanıt derecesi) ile ilişkisinin araştırılması planlanmıştır. Bu yolla, LAG-3 molekülünün DBBHL hastalarındaki ekspresyon durumunun ortaya konması ve prognostik değeri olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

GENEL BİLGİLER

TARİHÇE

Geçmişte, lenfoma patolojisi ve klasifikasyon sistemleri morfolojik bulgulara dayanılarak tanımlanmakta olup, Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DBBHL)’nın kökeni ve genetik özellikleri bilinmemekteydi. 1969 yılında, DBBHL’nin diffüz histiyositik lenfoma olarak adlandırıldığı, Henry Rapaport’un önermiş olduğu klasifikasyon sistemi yaygın kullanıma girmiştir(9). Ancak, immünolojinin gelişmesiyle birlikte, immün sistemin oldukça kompleks bir yapıya sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Çeşitli immün işaretleyicilerin kullanılmasıyla birlikte, 1973 yılında Collins ve ark. Sternberg Sarkomu’nun (şu anda T lenfoblastik lenfoma olarak bilinen sarkomun) T hücre serisine ait olduğunu(10) ve bir sene sonra, Jaffe ve ark. Folliküler Lenfoma’nın B hücre serisine ait olduğunu göstermiştir(11).

Monoklonal antikorların yaygın ve ulaşılabilir hale gelmesini, moleküler genetik çalışma uygulamaları takip etmiştir. Başta tek gen çalışmaları ve daha sonra ileri ve bütüncül analiz yöntemleri olmak üzere yeni yöntemlerin uygulanması ile, DBBHL’yi de içeren lenfomalar daha derin bir anlayışla ele alınmaya başlanmıştır(12).

Dünya Sağlık Örgütü 2017 Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Sınıflaması

Günümüzde konsensus sağlanmış olan lenfoma sınıflaması 2017 tarihli Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) dördüncü baskısında yer alan sınıflamadır. DBBHL, diffüz paternde dizilenim gösteren büyük B hücrelerinden oluşan neoplazi olarak tanımlanmıştır. Büyük olarak tanımlanan boyut, aynı dokuda bulunan benign histiyosit nukleusundan daha iri olması şeklinde tanımlanmıştır(13)(14).

2017 yılında DSÖ, DBBHL sınıflamasını güncellemiştir(Tablo 1)(15). Yeni sınıflamada 2008 yılındaki sınıflamaya göre yapılan değişiklikler şu şekildedir(15).

1. Germinal Merkez (GM) B Hücresi tipi ya da Aktive B Hücreli Tip/Germinal Merkez Dışı Tip şeklinde hücre orijini patoloji raporunda yer almalıdır.

Tablo 1: DBBHL sınıflamasında 2017 DSÖ güncellemesi: Alt tipler ve ilişkili antiteler

Diffüz büyük B hücreli lenfoma, NOS Germinal merkez B hücreli ya da aktive B hücreli/Germinal merkez dışı tip MYC ve BCL-2 ikili eksprese eden CD5+
DBBHL alt tipleri T hücresi/histiyositten zengin büyük B hücreli lenfoma Santral sinir sisteminin primer DBBHL'si Primer kutanöz DBBHL, bacak tipi EBV pozitif DBBHL, NOS
Diğer büyük B Hücreli Lenfomalar Primer mediastinel(timik) büyük B hücreli lenfoma İntravasküler büyük B hücreli lenfoma Kronik inflamasyon ilişkili DBBHL Lenfomatoid granülomatozis ALK pozitif büyük B hücreli lenfoma Plazmablastik lenfoma HHV8+ DBBHL, NOS Primer effüzyon lenfoması
Ara özellikler gösteren vakalar Yüksek dereceli B hücreli lenfoma, MYC ve BCL2 ve/veya BCL6 translokasyonu gösteren Yüksek dereceli B hücreli lenfoma, NOS B hücreli lenfoma, sınıflandırılmayan, DBBHL ve Klasik Hodgkin Lenfoma arası özellikler gösteren

NOS: Başka türlü spesifiye edilemeyen, EBV: Epstein Barr Virus, HHV8: Human Herpes Virus 8

2. CD5 ekspresyonu, prognostik öneme sahip olması nedeniyle değerlendirilmelidir.

3. MYC ve BCL2 immünohistokimyasal ekspresyonunu (ikili ekspresyon) ek prognostik faktör olduğundan belirtilmesi gerekmektedir.

4. B Hücreli Lenfoma, Sınıflandırılmayan, DBBHL ve Burkitt Lenfoma Arası Özellikler Gösteren, adındaki provizyonel kategori kaldırılmış ve yerine iki yeni kategori eklenmiştir.

a. Yüksek Dereceli B Hücreli Lenfoma, MYC ve BCL2 ve/veya BCL6 Translokasyonu Gösteren (“Double-hit” veya “Triple-hit” lenfoma)

b. Yüksek Dereceli B Hücreli Lenfoma, Sınıflandırılmayan

EPİDEMİYOLOJİ

DBBHL, dünya genelinde en sık görülen non-Hodgkin lenfoma türüdür(16)(1). Birleşik Devletler’de 2016 yılında ortalama 25380 yeni vaka ile insidans hızı %6,3 olarak hesaplanmıştır. Median yaşı 7. dekad olmakla birlikte genç erişkinlerde ve nadiren çocuklarda da görülebilir(1).

ETİYOLOJİ

DBBHL’nin etyolojisi hala bilinmemektedir. Genellikle de novo gelişmekle birlikte, Kronik lenfositik lösemi/küçük lenfositik lenfoma, Folliküler lenfoma, Marjinal zon lenfoma ya da Nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfoma gibi daha az agresif bir lenfomadan dönüşüm sonucu da gelişebilmektedir (sekonder DBHHL)(17). Predispozan faktörler arasında, moleküler aberasyonlara yol açan maddeler yanı sıra konjenital ve kazanılmış immün yetmezlik halleri bulunmaktadır(18).

Pestisitler, fertilize edici maddeler ve ilaçlar gibi pek çok kimyasal maddenin etyolojide etkili olabileceği öne sürülmüştür(19). Alkilleyici ajanlar, özellikle iyonizan radyasyon ile birlikte maruz kalındığında, sekonder lenfoma gelişim insidansını belirgin ölçüde artırmaktadır(18).

Özellikle organ transplantasyonu sonrası iatrojenik olarak immün sistemi baskılanan bireylerde, öncelikle santral sinir sisteminde olmak üzere, diffüz agresif lenfomaların görülme sıklığı artmıştır(13).

EBV (Epstein Barr Virus), DBBHL’yi de içeren çok çeşitli lenfoproliferatif hastalıkla ilişkili bulunmuştur(20). Hemen tüm bireyler yaşam sürelerinin bir noktasında EBV ile karşılaşır ve EBV maruziyeti sonrası hayat boyu süren latensi gözlenir. İmmün sistemdeki zayıflama ile birlikte, bağışıklık sistemi hücreleri EBER, EBNA ve LMP gibi proteinleri eksprese etmeye başlarlar(21). EBV’nin, aynı

zamanda, DBBHL hücrelerinin hayatta kalması için gerekli olan NFκB yolağını indüklediği bilinmektedir(22). Aynı zamanda, yine bağışıklık sistemi üzerine etkili insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV) ve HHV-8'in de DBBHL dahil pek çok lenfoid malignite patogeneğinde rol oynadığı bilinmektedir.

YERLEŞİM YERİ

Olgular, nodal ve ektranodal hastalık ile başvurabilmekle birlikte, hastaların %40 kadarında hastalık ektranodal alana sınırlıdır(23)(24). En sık karşılaşılan ektranodal alan, mide ve ileoçekal bölge başta olmak üzere gastrointestinal sistemdir. Diğer sık görülen ektranodal alanlar ise kemik dokusu, testis, dalak, Waldeyer halkası, tükrük bezi, tiroid, karaciğer, böbrekler ve adrenal glandlardır(17). Böbrek ve adrenal gland tutulumu, santral sinir sistemi yayılımı açısından daha yüksek riskli bulunmuştur(9).

KLİNİK PREZENTASYON

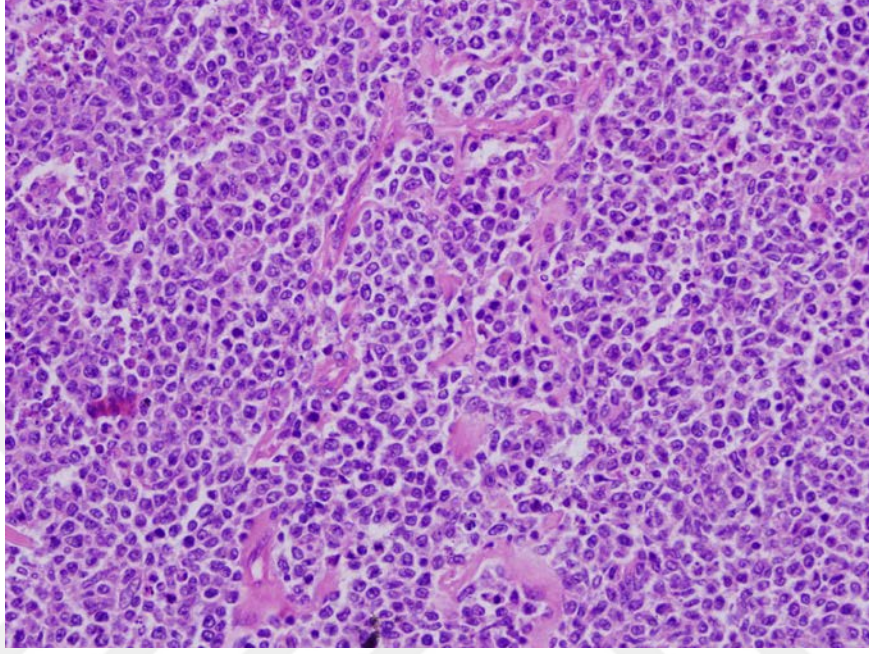
Klinik olarak çoğu vaka, bir veya birden fazla lenf nodunu veya ektranodal bölgeyi tutan, hızlı büyüyen tümör kitlesi ile prezente olur(15)(18). DBBHL vakalarının üçte birinde B semptomları görülür (ateş, kilo kaybı, gece terlemesi). Ayrıca bazı vakalarda tutulan organa bağlı semptomlar eklenebilir. Serum laktat dehidrojenaz (LDH) ve Beta-2-mikroglobulin genellikle normal seviyelerin üzerine çıkar. Hastaların yarısı Evre I-II hastalığa sahipken, diğer yarısı Evre III-IV hastalık ile başvurur.

Kemik iliği tutulumu, çalışmalar arasında değişkenlik göstermekle birlikte %10-20 civarındadır ve iki farklı şekilde görülür; konkordan (kemik iliğinin DBBHL ile tutulumu) ve diskordan(kemik iliğinin düşük dereceli B hücreli lenfoma ile tutulumu). Yalnızca konkordan tutulum durumunda genel sağkalım kötü yönde etkilenir(25).

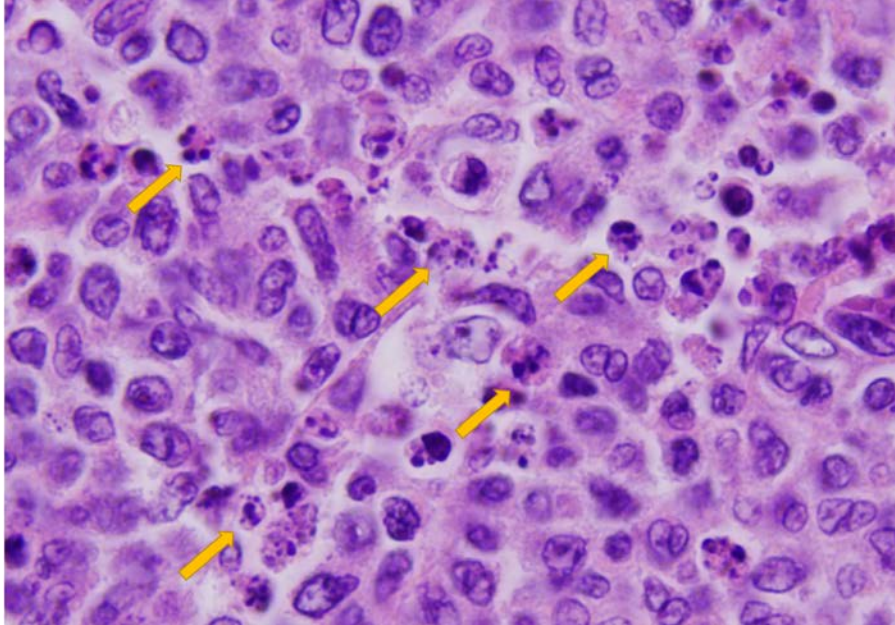
HİSTOMORFOLOJİ

Hastalığa verilen DBBHL ismi morfolojik bulguları açıklar niteliktedir. Lenfoma hücreleri iri olup diffüz paternde dağılım gösterir ve normal nodal ya da ektranodal yapıyı, kısmen veya tamamen ortadan kaldırır(26). İnce fibrozis tarafından lenfoma hücre grupları kompartımanlara ayrılır ve bazen skleroz görülür (Şekil 1). Coğrafik nekroz alanları görülebilir. Tek hücre apoptozları belirgin olabilir

ve artmış mitotik aktivite görülebilir (Şekil 2). DBBHL vakalarının %10'unda yüksek proliferatif aktiviteye bağlı olarak yıldızlı gökyüzü manzarası görülebilir. Zeminde reaktif T hücreleri ve histiyositler hemen her zaman mevcuttur(27).



Şekil 1: DBBHL olgusunda tümör hücrelerinin diffüz paternde dizilimi ve arada ince fibröz bantlar (Hematoksilen&Eozin, X200)



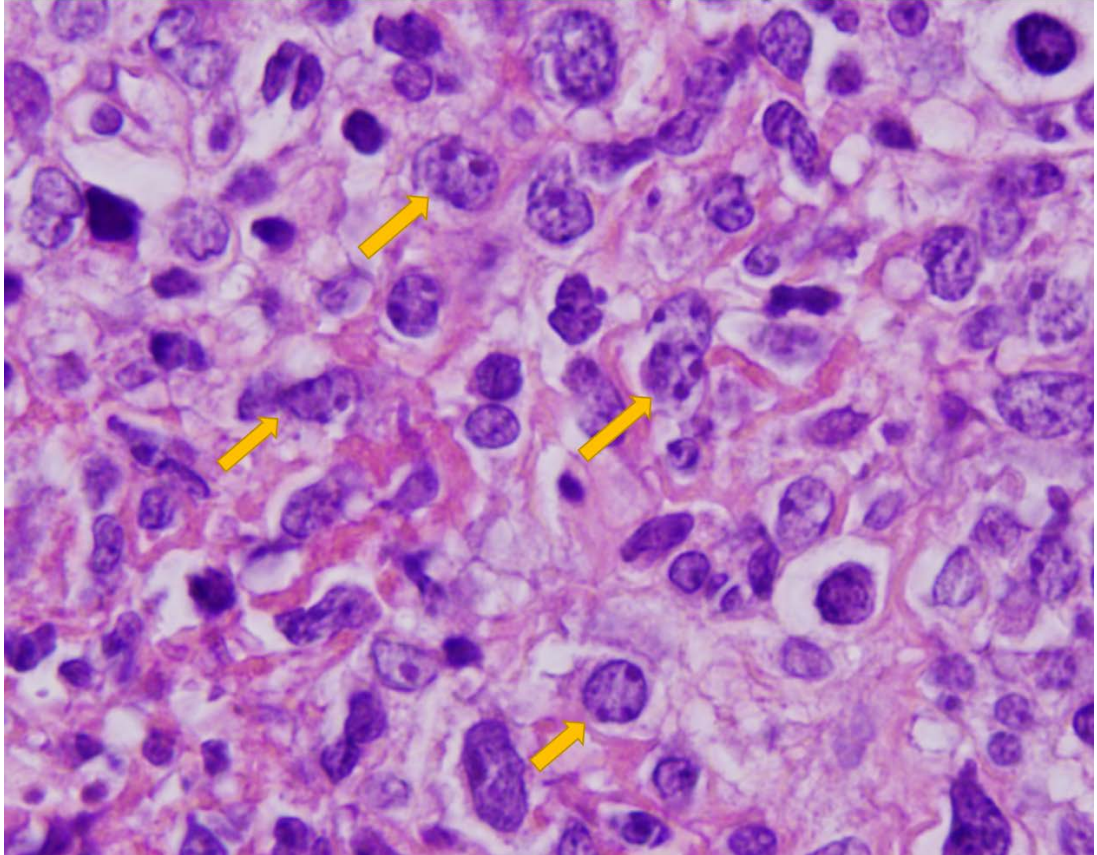
Şekil 2: DBBHL olgusunda, tümör hücre apoptozuna bağlı apoptotik cisimcikler (Hematoksilen&Eozin, X1000)

Sitomorfolojik özellikler ise oldukça değişkendir. DBBHL'nin birçok varyantı tanımlanmış olsa da, sentroblastik, immünoblastik ve anaplastik varyantlar en sık kullanılanlardır(27).

Sentroblastik Varyant

En sık görülen varyant olup tüm DBBHL vakalarının yaklaşık %80'ini oluşturur. Sentroblastlar, orta büyüklükte sitoplazmalı, yuvarlak ve oval veziküler kromatinli hücreler olup, bu hücreler küçük boyutlu, nükleer membrana yakın ve periferde yerleşmiş 2-3 adet nükleol içerirler (Şekil 3).

Bu varyant aynı zamanda, %90'dan fazlası sentroblastlardan oluşan monomorfik tümörlerden, sentroblastlar, sentrositler ve immünoblastlardan oluşan polimorfik tümörlere uzanan bir spektrum gösterir(27).



Şekil 3: Sentroblastik varyant DBBHL olgusunda, sentroblastik hücreler(sarı oklar) (Hematoksilen&Eozin, X1000)

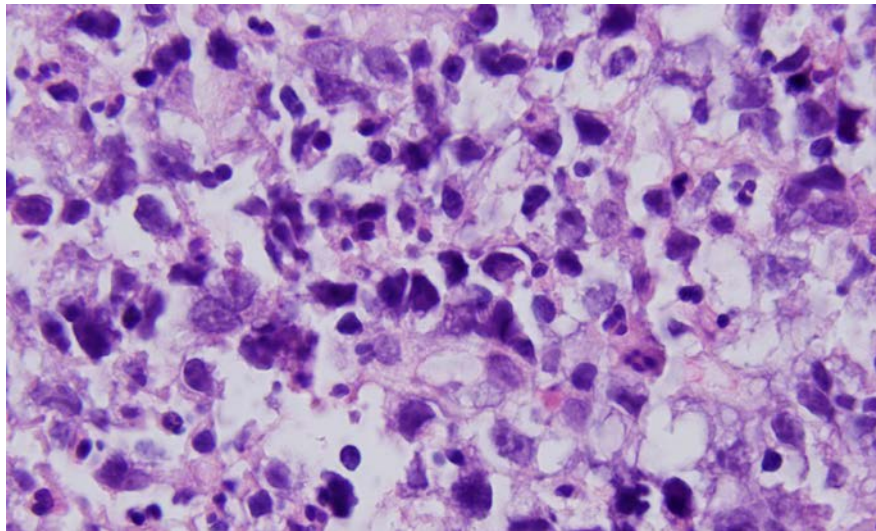
İmmünoblastik Varyant

Bu varyant, tüm DBBHL vakalarının %8-10'unu oluşturur ve neoplastik hücrelerin %90'ından fazlasını immünoblastik hücrelerin oluşturması olarak tanımlanır(15). İmmünoblastlar iri lenfoid hücreler olup her birinin orta-geniş bazofilik sitoplazması ve belirgin, santralde lokalize trapezoid şekilli nükleolleri vardır. İnce kromatin bantlar nükleer membrana tutunur (örümcek bacağı görünümü). Bazı vakalarda, immünoblastlar belirgin plazmasitoid diferansiasyon gösterirler(27).

Ancak vakaların çoğu %90 oranında klasik immünoblast içermediği için bu eşiği aşamamaktadırlar, bu nedenle, geçtiğimiz yıllarda, Horn ve ark. immünoblastik varyant tanımının %10'dan az oranda sentroblast içeren vakalar olarak değiştirilmesi konusunda, immünoblastik ve plazmasitoid hücrelerin tümörün %90'ından fazlasını oluşturduğu vakaları dahil edebilmek için öneride bulunmuştur(28).

Anaplastik Varyant

Daha nadir görülen bir varyant olup tüm DBBHL vakalarının %3'ünü oluşturur. Anaplastik varyant DBBHL'de görülen tümör hücreleri, pleomorfik ya da bizaar nükleuslara sahip belirgin irileşme gösteren hiperkromatik hücrelerdir. Tümör hücreleri, Hodgkin ve Reed-Sternberg hücrelerini ve Anaplastik Büyük Hücreli Lenfoma hücrelerini taklit edebilir. Anaplastik varyant, sıklıkla kısmi ya da yaygın sinüzoidal patern gösterir(27)(Şekil 4).



Şekil 4: DBBHL, anaplastik varyant (Hematoksilen&Eozin, X1000)

İMMÜNOFENOTİİK ÖZELLİKLER

İmmünofenotipin belirlenmesi DBBHL tanısı koymak için gerekli olup akım sitometrisi ya da immünohistokimyasal çalışmalar ile yapılabilir. DBBHL'nin neoplastik hücreleri, CD19, CD20 ve CD22 gibi pan B hücresi antijenlerini ve aynı zamanda PAX5, BOB1 ve OCT2 gibi transkripsiyon faktörlerini eksprese eder(29)(26). Olguların %50-70'inde hücreler, başta IgM ve daha az sıklıkta IgG ve IgA olmak üzere sitoplazmik ya da membranöz immünglobulin ekspresyonu gösterir(30). DBBHL olguları pan-T antijenleri için negatiftir(Tablo 2)(27).

Tablo 2: DBBHL'lerde sıklıkla eksprese edilen antijenler

İşaretleyiciler	Sıklık	Önemi
CD19	Sık	Tanı, hedef tedavi
CD20	Sık	Tanı, hedef tedavi
CD22	Sık	Tanı, hedef tedavi
CD79a/CD79b	Sık	Tanı
PAX5	Sık	Tanı
IG	%50-75, IgM daha sık	Tanı
CD5	%5-10	Prognoz
CD30	Değişken ekspresyon, anaplastikte daha sık	Prognoz, hedef tedavi
CD10	%30-60	Bu üç işaretleyici (CD10, BCL6, MUM1) GM ve GM dışı fenotipi belirlemek için kullanılır)
BCL6	%60-90	
MUM1	%35-65	
Ki-67	Her vakada değişken ekspresyon, sıklıkla>%40	Proliferatif işaretleyici
MYC	%20-40	Koekspresyonu belirler
BCL2	Sık	Prognoz, hedef tedavi
P53	Belirlenen eşik değere bağlı olarak değişken	Prognoz

DBBHL: Diffüz Büyük B hücreli Lenfoma, GM: Germinal merkez, Ig: İmmünglobulin

İmmünfenotipleme, tanının desteklenmesi amacıyla B hücre serisini ortaya koymak dışında, potansiyel tedavi hedeflerinin belirlenmesinde rol oynadığı için de önemlidir. Örneğin, lenfoma hücrelerinde CD20 ekspresyonu, Rituximab (anti-CD20) tedavisi için bir endikasyondur. CD19 ve CD22 de bu amaçla kullanılabilir(31). DBBHL vakalarının %10-15'i CD30 ile pozitifdir ve özellikle standart kemoimmünoterapide başarısızlığa uğranan hastalarda, anti-CD30 terapinin faydası olabileceği gösterilmiştir(32).

Olguların %15-20'sinde ise, kromozom 9p24.1 deki PD-L1/L2 amplifikasyonu sonucu PD-L1/L2 ekspresyonu görülür ve bu olguların büyük bir kısmı PD1 inhibitör tedavilerine olumlu yanıt verir(33).

Günümüzde, hastaların tedaviye yanıtını tahmin etmek ve hedefe yönelik yeni tedaviler geliştirmek amacıyla, önemli işaretleyicilerin varlığı ve yokluğunu araştıran çok sayıda immünofenotipik analiz çalışmaları yürütülmektedir.

Hücre Orijini Sınıflaması

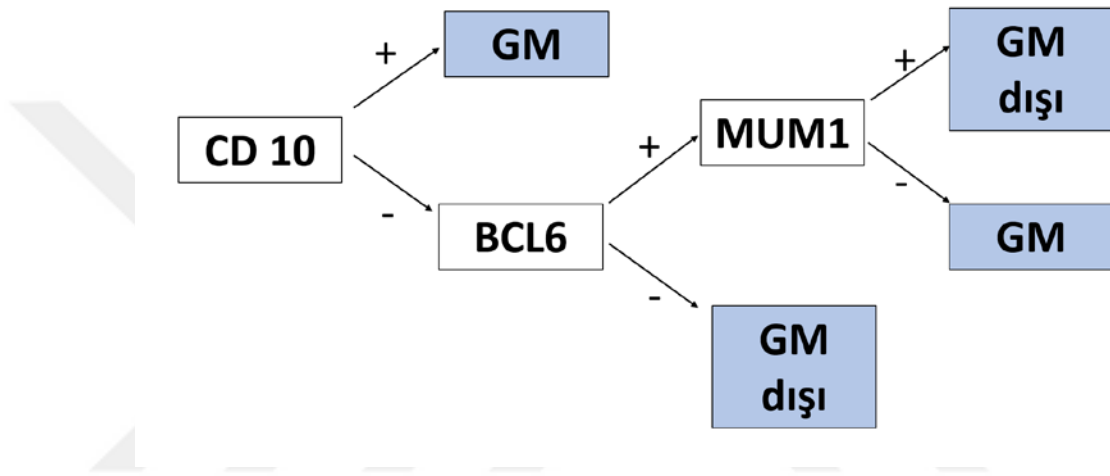
DBBHL olgularını GM ve GM dışı olarak sınıflamak amacıyla gen ekspresyon çalışmaları kullanılmaktadır. Ancak, bu yöntemin formalin fikse parafine gömülü dokularda uygulanamaması, günlük pratikteki kullanımını oldukça kısıtlamaktadır. Bu sorunu çözmek amacıyla çeşitli immünohistokimyasal algoritmalar geliştirilmiştir(34). Bunlardan Hans algoritması ilk bildirilen ve en yaygın kullanılanıdır. Bu sistemde, CD10, BCL6 ve MUM-1 kullanılmakta olup, tümör hücrelerinin %30'u ve üstü boyanmış ise tümör, o işaretleyici yönünden pozitif kabul edilir(34).

GM tümörler CD10+ ya da CD10-/BCL6+/MUM1- olarak izlenirken, GM dışı tümörler CD10-/Bcl6+/MUM1+ ya da CD10-/Bcl6-'tir (34). Hans algoritması hücre orijinini belirlemede gen ekspresyon çalışmaları ile %76 oranında uyumluluk göstermektedir(Şekil 5) (34).

GENETİK ÖZELLİKLER

DBBHL olgularına uygulanan konvansiyonel sitogenetik analiz çalışmaları kromozomal anomaliler konusunda genel bir bakış açısı sağlamıştır. Genellikle, kompleks karyotipler, kliniği agresif olan vakalar ve tedaviye direnç ile ilişkili

bulunmuştur. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (KGH) çalışmaları sonucunda ise, çok sayıda kromozom loküsü kaybı ve kazanımı ile birlikte sayısız kombinasyonlar oluşabildiği ortaya çıkmıştır(35)(36). Spesifik kazanım ve kayıpların, hücre orijini klasifikasyonu ile korele olduğu gösterilmiştir(36).



Şekil 5: Hans algoritması (GM: Germinal merkez)

DBBHL olgularında üç ana translokasyon izlenmektedir. En sık olarak, vakaların %30'unda, kromozom 3q27 lokusunda Bcl-6'da translokasyon izlenmiştir(37). Ayrıca t(14;18)(q21;q32)/IGH-BCL2 translokasyonu, vakaların %20-30'unda mevcuttur(38). 8q24'te yer alan MYC translokasyonu ise, olguların %10-15'inde görülür(38).

Rutin pratikte, konvansiyonel sitogenetik çalışmalar için taze doku bulmak genellikle mümkün olmamaktadır. Bu nedenle, formalin fikse parafine gömülmüş örneklerde, floresan in situ hibridizasyon(FISH) yöntemi, Bcl-6, Bcl-2 ve MYC gen rearanjmanlarını belirlemede yardımcı bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Hem “breakapart” (BCL6 ve MYC) hem de füzyon (IGH-BCL2) problemleri kullanılabilir. FISH yönteminin genel dezavantajı ise, bu çalışmaların belli bir alana odaklanması ve geri kalan sitogenetik profilin değerlendirilmesine olanak vermemesidir(27).

Gen Ekspresyon Profil Çalışmaları

Alizdeh ve ark. gen ekspresyon profili çalışmasını DBBHL vakalarına ilk uygulayanlar arasındadır. Bu araştırmacılar, DBBHL olgularını, GM(%40-50), GM-dışı (%50-60) olarak iki gruba ayırarak CHOP veya R-CHOP tedavisine yanıtı incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, GM grubu, diğer gruba göre belirgin ölçüde daha iyi sağ kalım göstermiştir(39)(40).

Dybkaer ve ark. ise, B hücrelerini reaktif tonsil dokusundan seçerek; 5 adet B hücresi ilişkili gen imzası belirlemiştir. Bunlar; naiv, sentrosit, sentroblast, hafıza ve plazmablast B hücreleri şeklindedir. Bu imzalar çok sayıda genetik alterasyon ile ilişkili bulunmuştur. Örneğin, sentroblastik tümörler çok sayıda genetik alterasyon içerirken, sentrositik hücrelerde daha az genetik alterasyon saptanmış olup daha sıklıkla TP53 mutasyonu görülmüştür(41).

Yeni Nesil Gen Sekanslama

Geçtiğimiz on yılda, tek gen değerlendirme yöntemleri sayesinde, gen mutasyonları ya da delesyonlarının DBBHL patogenezinde rol oynadığı bilinmekteydi. Ancak Yeni Nesil Gen Sekanslama (YNGS) yöntemi, DBBHL vakalarındaki genetik değişikliklerin öncekilere göre çok daha kapsamlı olarak tanımlanmasını sağlayarak, bu konuda daha geniş ve derin bir anlayış kazanmamızı sağlamıştır.

YNGS yöntemi sonucunda, DBBHL hücrelerinin birden fazla kez klonal ekspansiyona uğradığını ve genetik mutasyonların bu sürecin herhangi bir anında meydana gelebileceğini ortaya koymuştur(42). DBBHL’de görülen mutasyonlar sürücü ve yolcu mutasyonları olarak ikiye ayrılmaktadır. Genellikle, sürücü mutasyonlar patogenezin daha erken basamaklarında görülür ve lenfoma gelişiminde anahtar rol oynayarak hücresel süreçleri bozar. Yolcu mutasyonların ise, patogeneizde önemli rol aldığı düşünülmemektedir ve sıklıkla zararsız yan olaylar olarak ele alınmaktadır(42).

DBBHL’de görülen genetik mutasyonlar, çok çeşitli hücresel süreçler ve yollarla ilişkili olabilmektedir. Histon modifikasyonu(metilasyon ve asetilasyon), hücre büyümesi, metabolizma, diferansiasyon, apoptozis, sağ kalım, migrasyon,

DNA hasarına yanıt, B hücre reseptör sinyalleri, “Toll-like” reseptör sinyalleri, anjiyogenez ve immün düzenlenme en sık görülen mutasyonlardandır(42)(43).

Gen mutasyonlarının varlığı, hem hastalık patogenezinin anlaşılması, hem de tedavi ajanların geliştirilmesi için potansiyel hedef oluşturması açısından önemlidir (31).

PROGNOSTİK FAKTÖRLER

DBBHL, oldukça heterojen bir hastalık grubu olup hastalarda klinik seyir ve prognoz çok farklı olabilmektedir, bu nedenle tedavi belirlemek için, hastaların risk durumlarının ortaya konması büyük önem taşımaktadır(27).

İnternasyonal prognostik indeks (IPI)

1994 yılında DBBHL hastalarını risk açısından değerlendirmek için IPI skoru geliştirilmiştir(44). IPI skarlama sistemi, beş adet değişkeni kapsamaktadır; yaş (60 yaş üstü), ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) performans durumu (0-1 veya 2-4), serum LDH seviyesi (yüksek ya da normal) ve ektranodal tutulum bölgesi sayısı (0-1 ya da 2 ve üzeri). Her bir değişken bir puana denk gelmektedir. Bu sayede IPI, hastaları; düşük risk (skor 0 ve 1), düşük-orta risk (skor 2), yüksek-orta risk (skor 3) ve yüksek risk (skor 4-5) olmak üzere 4 risk gruba ayırmaktadır (32).

IPI uzun yıllar boyunca yaygın olarak kullanılmış olmakla birlikte, zamanla Rituksimab'ın tedaviye dahil edilmesi, IPI'nin belirleyici gücünü düşürmüştür. NCCN (National Cancer Center Network); IPI'nin, bazı hasta anomalilerine ve kategorisel değişkenlere cevap veremediğini öne sürmüş olup, yeni ve geliştirilmiş bir IPI sisteminin kemoimmünoterapi açısından faydalı olabileceğini öne sürmüştür(3).

Daha sonrayapılan NCCN-IPI skarlama sisteminde, yaş ve serum LDH seviyesi kendi içinde tekrar ikiye ayrılmıştır. Ayrıca, ektranodal tutulum alanları spesifik bölgelere göre (kemik iliği, akciğer, beyin, karaciğer/gastrointestinal bölge) belirlenmiştir. Bu sistemde toplamda en fazla 8 puan verilebilmektedir ve hastalar düşük (0-1 puan), düşük-orta (2-3 puan), yüksek-orta(4-5 puan) ve yüksek(6 puan ve üzeri) olmak üzere 4 ayrı risk grubuna dahil edilmiştir(33) (Tablo 3).

Tablo 3: NCCN-IPI Skorlaması

Parametreler	Skor
Yaş	
40-60	1
61-75	2
>75	3
LDH, normalize edilmiş	
1-3	1
>3	2
Ann Arbor evre III-IV	1
Ekstranodal hastalık (kemik iliği, santral sinir sistemi, gastrointestinal trakt ya da akciğer)	1
Performans durumu ≥ 2	1

TEDAVİ

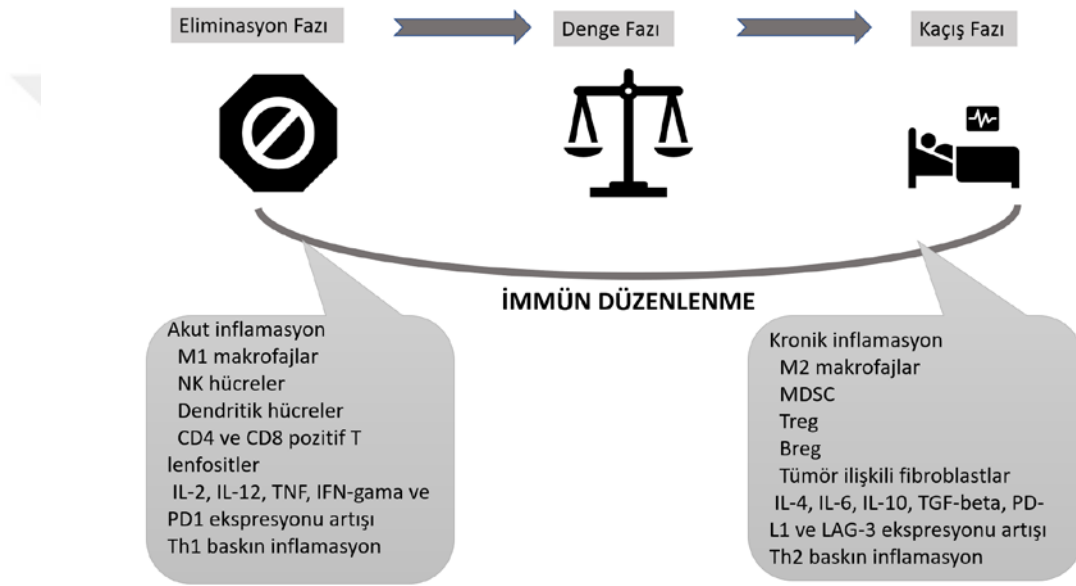
DBBHL hastalarında standart tedavi rituksimab, siklofosfamid, doksorubisin, vinkristin ve prednizon'dur(R-CHOP). Bu tedavi kullanılarak vakaların %60-70'inde kür sağlanabilmektedir(45). Ancak, vakaların %30-40 kadarında relapslar görülür veya küçük bir hasta grubunda tedaviye dirençli hastalık görülebilir. Bu hastalar için güncel tedavi seçenekleri yeterli değildir. Özellikle genç hastalarda otolog kök hücre nakli sıklıkla önerilmektedir(2).

Hastaların bir kısmında ise kurtarma tedavileri uygulanmakta olup bu hastaların büyük bir kısmında bu yaklaşım ile kür sağlanamamaktadır. Komorbidite nedeniyle kök hücre nakli yapılamayan hasta grubunda prognoz oldukça kötüdür ve yapılan çalışmaların büyük bir kısmı bu hasta grubunu hedeflemektedir(27).

Günümüzde DBBHL hücrelerinde sinyal yollarını inhibe eden çok sayıda hedefe yönelik tedavi yöntemleri keşfedilmiş olup çok sayıda yeni terapötik ajanın yakın zamanda kullanıma girmesi planlanmaktadır(46)(47)(48).

TÜMÖRLERDE İMMÜNİTE

Tümör gelişimi sırasında, bağışıklık sistemi tümör hücrelerini yok etmeye çalışır; ancak bazı tümör hücreleri bağışıklık hücrelerinden kaçmayı başarabilir(49). Neoplastik hücrelerin, vücudun savunma sistemi ile etkileşimi üç basamakta değerlendirilir(Şekil 6)(49).



Şekil 6: Tümör mikroçevresinde bulunan iltihabi hücreler ve tümör hücrelerinin bağışıklık yanıtı ile etkileşimi (NK: Doğal katil hücreleri, IL: İnterlökin, TNF: Tümör Nekroz Faktörü, IFN: Interferon, PD1: Programlı hücre ölümü-1, PD-L1: Programlı hücre ölüm ligandı-1, Th: Yardımcı T hücreleri, MDSC: Myeloid derive süpresör hücreler, Treg: Düzenleyici T hücresi, Breg: Düzenleyici B hücresi, TGF: Dönüştürücü büyüme faktörü)

Eliminasyon Fazı

Akut faz olarak da adlandırılan bu evrede, tümör yönünde değişim gösteren hücrelerin çoğalmasını engellemek için çeşitli hücreler proliferasyon gösterir ve neoplastik gelişimi durdururlar. Bu hücreler, pro-inflamatuar bağışıklık yanıtında rol alan Tip 1 makrofajlar, dendritik hücreler, doğal öldürücü(NK) hücreler, CD8 sitotoksik T hücreler ve CD4 Th1 hücrelerdir(49).

Denge Fazı

Tümöre ait hücre serilerinden bir kısmı bağışıklık yanıtına rağmen hayatta kalır. Neoplastik hücreler latent hale gelir ve immün sistem hücreleri, tümör çevresindeki yerlerini korur. Bu süreç yıllarca sürebilir(49).

Kaçış Fazı

Tümör hücresi bağışıklık sisteminden kurtulur ve otonom büyüme özelliği kazanır. Bu aşamada tümör metastaz yapabilme özelliği edinir ve bağışıklık baskılayıcı hücreler daha baskın hale gelir. CD4 ve FOXP3 ("Forkhead box P3) pozitif düzenleyici T hücreler(Treg) ve Tip II makrofajlar baskın hale gelir ve CD8 pozitif T hücreleri inhibe ederler(49).

Tümör Mikroçevresi

Tümör mikroçevresi tümörün yer aldığı ve devamlı ilişki içerisinde olduğu hücrel ve moleküler çevreyi ifade eder. B hücreli lenfomalarda, tümör hücresinin yaşamını devam ettirmesi ve proliferasyonunu düzenlemede, immün kaçışta ve ilaç direncinde mikroçevre önemli rol oynamaktadır(50).

Lenz ve arkadaşları, DBBHL'de izlenen farklı özellikteki mikroçevrelere göre gen ekspresyon imzasını belirleyerek, stromal-1 ve stromal-2 adında farklı iki mikroçevre tanımlamıştır(51). Stromal-1 imzası daha çok içeren eden grupta, pek çok mezenkimal hücre tarafından eksprese edilen, hücre dışı matriks üretimini düzenleyen genler bulunmaktadır. Stromal-1 imzasına ait komponentlerden birisi fibronektindir. Fibronektin, malign lenfoma hücrelerinin arasındaki fibrotik alanlarda bulunan bir proteindir(27). Bu fibrotik reaksiyonun bir başka nedeni de pek çok fibrotik durum ve hastalıkla ilişkili bulunan CTGF ("Cytokine growth factor")'dür. CTGF aynı zamanda tümör büyümesini ve epitelyal kanserlerin metastazını artıran bir moleküldür(52). Stromal-1 imzası bulunan tümörlerin bir başka özelliği de tümör ilişkili makrofajlar, myeloid derive süpresör hücreler ve monositlerin mikroçevrede yoğun olarak bulunmasıdır. Hayvan modellerinde bu hücreler, matriks metalloproteinazları üreterek, T hücre immün yanıtını baskılamakta olup anjiyojenez sürecinin başlangıcında rol oynayarak, malign hücre invazyonunu kolaylaştırıcı yönde etkiye bulunmaktadır(51).

Stromal-2 grubunda tümörlerde ise “angiogenic switch” adı verilen durum görülür, bu da tümör öncülü hiperplastik bir lezyonun, yeni kan damarları oluşturarak, malign tümöre ilerlemesinde rol oynar(53). Görece daha fazla stromal-2 gen imzası eksprese eden DBBHL olgularının artmış kan damarı yoğunluğuna bağlı olarak kötü prognoza sahip oldukları izlenmiştir (51).

Yapılan bir başka çalışmada ise, DBBHL olgularının %29’unda, β 2-mikroglobulin geninde aktivasyon kaybına yol açan mutasyon ve delesyonlar, olguların %21’inde ise, CD58 geninde inaktivasyon gözlenmiş olup bu iki molekül dolaşan T hücreleri ve doğal öldürücü hücrelerin tümör hücrelerini immün olarak tanınmasında kritik rol oynamaktadır(54).

Tümör mikroçevresindeki spesifik gen mutasyonları; gen ekspresyon profillerini etkilemekte ve direkt olarak lenfoma hücrelerinde sinyal artışı ve bazı önemli sinyallerde kayba yol açmaktadır. Aynı zamanda mikroçevrede yer alan hücreler, genetik anomalilerin yokluğunda dahi tümör hücre yolaklarını stimüle edebilmektedir(55).

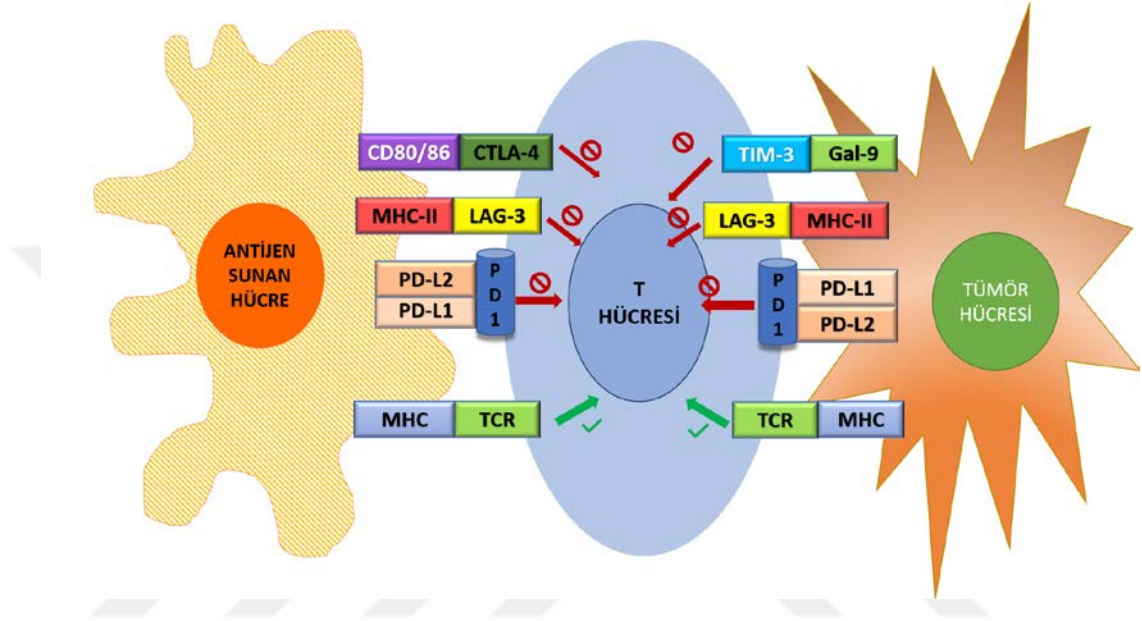
Tümör hücrelerinin ve mikroçevrede yer alan hücrelerin epigenetik modülasyonu(metilasyon gibi) da DBBHL patogenezinde önemli bulunmuştur ve kemoterapiye dirençte rol oynayabileceği bildirilmiştir(56).

Kontrol Noktası Blokajı

T lenfosit aktivasyon için, iki farklı sinyalin T lenfositte ulaşması anahtar noktayı oluşturur (Kevin Lafferty modeli). Bunlardan ilki, antijenik peptit major doku uyumluluk kompleksi (MHC)” in T hücre reseptörü (TCR)’ne bağlanması; ikincisi “antijen sunan hücreler (APC)” tarafından T lenfositlere sinyal gönderilmesidir. Bu sinyallerin T lenfositte ulaşmasının engellenmesi halinde T lenfositler etkili bir cevap oluşturamamaktadır (57).

Neoplastik hücreler, immün sistemin çalışmasını inhibe edici veya azaltıcı sinyaller üretebilirler. CTLA-4, PD-1, PD-L1/PD-L2, LAG-3, T hücre immünoglobulin müsin-3 (TIM-3) gibi sinyal yolakları T lenfositlerin tümöre karşı etkin yanıt oluşturmalarını engelleyen yolaklardır. Naiv T hücrelerine antijen sunarak T hücre aktivasyonunu başlatırlar. MHC-TCR sinyal yolağı T hücre aktivasyonunun ilk basamağı iken, ko-inhibitör immün kontrol noktaları tümör

mikroçevresinde T hücre aktivasyonunu inhibe eder. İmmün kontrol noktaları T hücreleri yüzeyinde izlenirken, immün kontrol noktalarının ligandları ise antijen sunan hücreler, tümör hücreleri ve diğer stromal hücrelerde bulunur(Gal-9: “Galectin-9”)(Şekil 7) (58).



Şekil 7: Tümör mikroçevresinde, antijen sunan hücreler

LENFOSİT AKTİVASYON GENİ-3 (LAG-3)

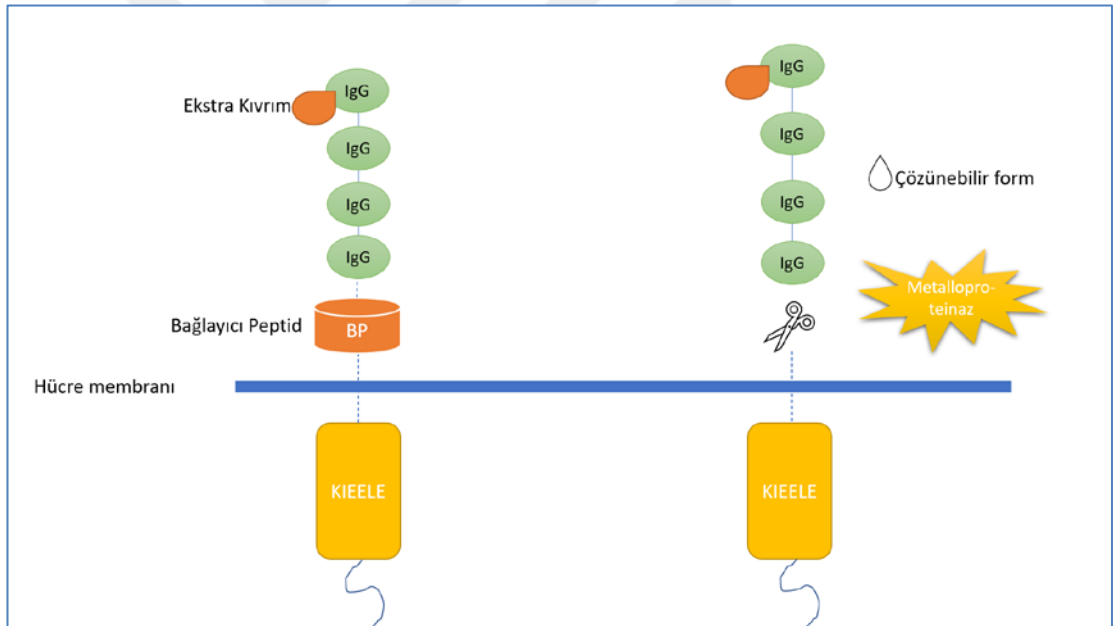
CTLA-4 ve PD1-PDL1'i hedefleyen kanser immünoterapisinin etkileyici başarısına rağmen, hastaların büyük bir kısmında tedavi başarısızlıkları yaşanmaya devam etmektedir, bu nedenle ilgi, LAG-3 gibi alternatif inhibitör reseptörlere yönelmiştir(5). LAG-3 (CD223), aktive T hücrelerinde eksprese edilen bir yüzey molekülüdür(59). LAG-3'ün ilk olarak, IL-2 bağımlı NK hücre serisindeki molekülleri seçici bir şekilde izole etmek için tasarlanan bir deneyde keşfedilmiştir(60).

Kendine özgü, 489 amino asitten oluşan membran proteini olup ileri analizlerde insanlarda 12. kromozomun kısa kolunun distal kısmında, CD4'e yakın bir alanda yer aldığı görülmüştür. Amino asit sekans analizi ile LAG-3'ün Ig süperailisinin bir üyesi olduğu anlaşılmıştır(42).

LAG-3 Yapısı

LAG-3 yapısal olarak CD4'e benzese de amino asit dizisi, CD4'ten daha farklı olup yalnızca %20 oranında benzerlik bulunmuştur. LAG-3, CD4'e homolog bir şekilde dört adet hücre dışı IgG bölümünden oluşur. Membrana en uzak alanda yerleşen IgG bölümü, ekstra kıvrım olarak da adlandırılan kısa bir aminoasit dizisi içerir. LAG-3 bağlayıcı peptid, metalloproteinazlar tarafından kesilebilir ve bu da serumda saptanabilen çözünebilir formun oluşmasını sağlar(Şekil 8)(61).

LAG-3 proteinin membrana uzak alanda yerleşim gösteren D1 kısmında kendine özgü, antikorların bağlanabileceği ekstra kıvrım ("loop") içerir(62). Ek olarak LAG-3'ün hücre içindeki bölümü görece daha kısa olup T hücre fonksiyon modülasyonunda önemli olan kendine özgü bir motif (KIEELE) içerir(63).



Şekil 8: LAG-3'ün yapısı

LAG-3 Ekspresyonu

LAG-3, pek çok yolla T hücrelerinin türüne göre aktive ve inhibe edici bir işaretleyici olarak rol oynamakta olup, CD4 ve CD8 T hücrelerinde, aktivasyondan sonra 3-4 gün boyunca eksprese edilmektedir(59). Ayrıca, rol tam olarak

anlaşılamasa da, NK hücrelerde ve aktive B hücrelerinde de eksprese edildiğine dair kanıtlar bulunmaktadır(64). Bir başka çalışmada ise, LAG-3 mRNA'sı timik medullada, splenik kırmızı pulpada ve serebellumun bazis bölgesinde bulunmuştur(65).

LAG-3 hücre membranında, CD8 ve CD3 TCR kompleksinde lokalize bulunur(66). LAG-3, T hücrelerinin aktivasyonunu takiben 24. saatte ilk olarak saptanabilirken, 2. günde pik yapmakta ve giderek azalmakla birlikte 8 güne kadar eksprese edilmektedir(6).

LAG-3 ve CD4 arasındaki yapısal homoloji nedeniyle LAG-3'ün Sınıf 2 MHC'ye bağlanması ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, LAG-3'ün, MHC sınıf 2 molekülüne CD4'ten daha yüksek afinite ile bağlandığı keşfedilmiştir. Bu da CD4 ile yarıştığı hipotezini ortaya çıkarmıştır(49). Ancak daha sonraki çalışmalarda, LAG-3'ün CD4-MHC Sınıf 2 ilişkisini bozmaktan çok, sitoplazmik kısmı ile inhibitör sinyalleri ortaya çıkardığı keşfedilmiştir(67).

LAG-3 Fonksiyonu

Artmış LAG-3 ekspresyonu, aşırı immün aktiviteyi engelleyerek, otoimmünite gelişmesini önleyen bir immün kontrol noktası molekülüdür. Ancak, tümör mikroçevresindeki devam eden antijen maruziyeti LAG-3 ekspresyonunun devamlı olmasına neden olur ve bu da lenfositlerde tükenme haline yol açarak inflamatuvar hücre proliferasyonunu ve sitokin üretimini bozar(5).

LAG-3'ün farklı T hücre tiplerinde farklı etkileri bulunduğu gösterilmiştir(58). İlk yapılan çalışmalarda, mikroarray yöntemleri kullanılarak LAG-3'ün, vücudun kendi antijenleri ile karşılaşan ve düzenleyici fenotipteki CD4 T hücrelerinde görece olarak daha aktif olduğu in vivo olarak bulunmuştur(68). Hodgkin lenfoma hastalarında, LAG-3+ CD4 T hücrelerinin azaltılmasının, tümöre özgü CD8 T hücre reaktivitesini artırdığı görülmüş olup bu bulgular, LAG-3'ün tümöre karşı olan immünite üzerinde baskılayıcı rol oynadığını düşündürmektedir(69). Yine aynı şekilde, daha yakın tarihli bir çalışmada kanser hastalarında tümör bölgesinde, LAG-3 negatif hücrelere göre, LAG-3 pozitif CD4 T hücrelerinde baskılayıcı fonksiyonda artış bulunmuştur(70).

Benzer etkiler CD8 T hücrelerinde de görülmekte olup LAG-3 yönünden baskılanmış CD8 T hücrelerinde, artmış proliferasyon ve sitokin üretimi göze çarpmıştır(71). T hücreleri üzerine olan olumsuz düzenleyici rolünden dolayı LAG-3, tek başına ve PD-1 ile komine olarak potansiyel bir immün tedavi hedefi olarak görülmektedir(72). LAG-3 ve tümörü infiltre eden lenfositlerin (TILs) ilişkisi tablo 4'te özetlenmiştir.

Tablo 4: LAG-3 ve TILs ilişkisi (LSECTin: “Liver sinusoidal endothelial cell lectin”)

TIL tipleri	LAG-3 ekspresyonu	Fonksiyon	Etkileyen Faktörler	Referans
CD4 T hücreleri	Artmış	LAG-3, CD4 T hücrelerine negatif düzenleyici etkide bulunur.	LAG-3/MHC-II etkileşimi, KIEELE motifi, gama zincir sitokinleri (IL-2, IL-7, IL-12 ve IFN- γ)	(73), (67)
CD8 T hücreleri	Artmış	LAG-3, CD8 T hücrelerinin efektör fonksiyonunu baskılar.	Koinhibitör moleküller (özellikle PD-1, LSECTin ve galectin-3)	(72), (74), (75), (76), (77), (78), (79), (80)
T düzenleyici hücreler (Treg)	Artmış	LAG-3, Treg hücrelerinin supresör etkisini artırır.	Ko-inhibitör moleküller, TGF- β ve IL-10	(58), (81), (82), (68)
Doğal katil hücreleri	Artmış	LAG-3 doğal katil hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder.	IL-12	(83), (84), (85)
Plazmasitoid dendritik hücreler	Artmış	LAG-3, plazmasitoid dendritik hücre aktivasyonunu suprese eder.	IL-6 artışı ve IFN- α 'nın azalması	(86),(87), (88)

MATERYAL VE METOD

HASTA SEÇİMİ

Çalışmamızda; T.C. Sağlık Bakanlığı İl Sağlık Müdürlüğü Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu'nun 2019-02/201 numaralı onayı ile, Tıbbi Patoloji Kliniğine, 01 Ocak 2007 - 01 Eylül 2019 tarihleri arasında kabul edilen, nodal ve ektranodal yerleşimli, insizyonel ve eksizyonel biyopsi materyallerinde Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma tanısı almış 210 adet hastaya ait dokuların, retrospektif olarak histopatolojik ve immünohistokimyasal özellikleri değerlendirildi. Bu hastalara ait sonuç raporları, parafin blokları, Hematoksilen&Eozin(H&E) ve immünohistokimya(İHK) boyalı preparatlar kliniğimizin arşivinden elde edildi. Hastaların kimlik bilgileri ve klinik verilerine hastanemizin otomasyon sisteminden ulaşıldı.

Değerlendirmeler sonucunda, tanı teyidi yapılabilen, çalışma için uygun miktarda ve nitelikte tümör alanı içeren 210 adet vaka çalışmaya dahil edildi.

İNCELENEN PARAMETRELER

Seçilen hastalara ait spesmenlerin biyopsi numarası, patoloji raporu tanısı, biyopsi alınma yeri, biyopsi alınma şekli, tanı verilme tarihi; hastaların yaşı, cinsiyeti, tanı anındaki hastalık evresi, IPI skoru ve R-CHOP tedavisine yanıt derecesi kaydedildi.

Vakalarda, 2017 basım tarihli, Hematopoietik ve Lenfoid Doku Tümörleri DSÖ Sınıflaması (2017, 4. Basım) kitabında belirtilen kriterlere göre tanı teyidi yapıldı(15).

CD10, Bcl-6 ve MUM-1 immünohistokimyasal çalışma sonuçları Hans Algoritmasına göre değerlendirilerek hücre orijinleri belirlendi.

Vakalara ait Ki-67 proliferatif aktivite indeksi, Bcl-2, CD5, CD30 ve C-myc immünohistokimyasal çalışma sonuçları değerlendirildi.

BLOK SEÇİMİ

Seçilen 210 adet hastaya ait, tru-cut biyopsi, insizyonel biyopsi ve eksizyonel biyopsi materyallerinden, 1 blok halinde örneklenmiş olanlarda mevcut blok, birden fazla blok halinde örneklenmiş olanlarda, uygun doku tespit ve takibi yapılmış yeterli miktarda tümör dokusu içeren 1 adet blok seçildi.

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMA

Seçilen bloklardan, pozitif yüklü Poli-L-lizinli lamlara 2-4 µm kalınlıkta tam yüz kesitler alındı. Daha sonra bu lamlara, rekombinan tavşan monoklonal LAG-3 antikor (Anti-Lymphocyte Activation Gene3 antibody [EPR4392(2)]-C-terminal); Ventana Benchmark XT tam otomatik boyama platformunda Roche Diagnostics Ultraview Universal DAB Detection Kiti kullanılarak uygulandı. Antikor, 1:1000 oranında dilüe edilerek kullanıldı. İmmünohistokimyasal boyanmanın basamakları tablo 5 ve tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 5: İmmünohistokimyasal boyamada otomatik cihaz öncesi basamaklar

1	Kesitler, pozitif yüklü lamlara alındıktan sonra 65 °C 30 dakika deparafinize edildi.
2	Deparafinizasyon işlemine, 2 kez 5 dakika ksilen ve ardından alkolde bekletilerek devam edildi.
3	Lamlar distile su ile yıkandı.

Tablo 6: İmmünohistokimyasal boyamada otomatik cihaz içi basamaklar

1	Deparafinizasyon
2	Antijen “retrieval” (EDTA “Cell Conditioning 1 (CC1) ile 1 saat inkübasyon
3	Primer antikor (Anti-LAG-3) ile 16 saat inkübasyon
4	Zemin boyaması için H&E ile 8 dakika inkübasyon
5	Zıt boyama için “Bluing Reagent” ile 4 dakika inkübasyon

İHK ÇALIŞILAN BELİRTEÇLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

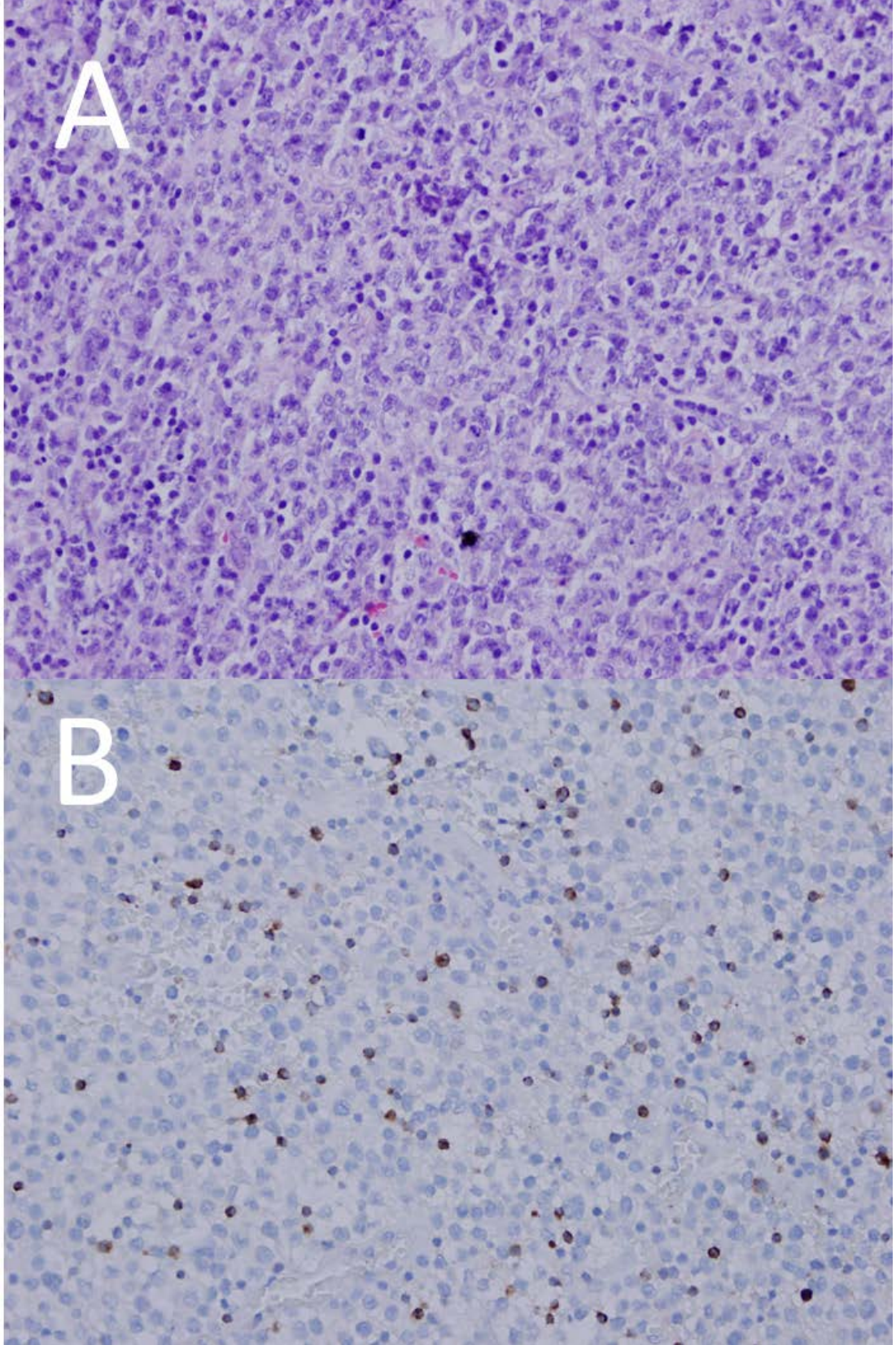
LAG-3 immünohistokimyasal çalışması uygulanan preparatlar, x40 alan objektifi ve x10 oküler lens ile 0,45 mm çapında görüş alanı sağlayan ışık mikroskobu (Olympus CX31RTSF, Olympus Optical Co. LTD.) ile değerlendirildi.

LAG-3 immünohistokimyasal antikor, DBBHL hücrelerinde ve tümörü infiltre eden lenfositlerde golgi paterninde ve sitoplazmik membranöz immünreaksiyon gösterdi (Şekil 9-12).

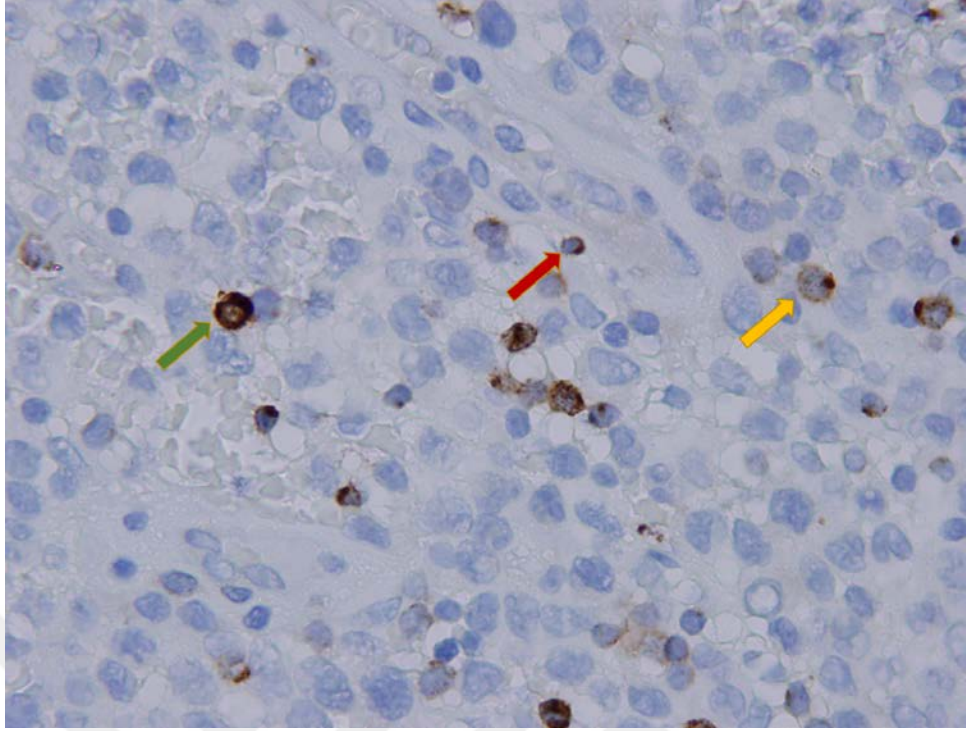
Tümör hücrelerindeki LAG-3 ekspresyonu oranı, Chen ve ark. çalışmasındakine benzer şekilde, kesitte yer alan tüm tümör alanı değerlendirilerek yüzde cinsinden verildi. Boyanmanın şiddeti ise, boyanma yok, zayıf boyanma(+), orta şiddette boyanma (++) ve şiddetli boyanma (+++) olarak 3 grupta skorlandı(89).

Tümör infiltre eden lenfositlerdeki LAG-3 ekspresyonu ise, literatürde yer alan önceki çalışmalar ile benzer olarak, sayısal olarak değerlendirilmiş olup, LAG-3 pozitif TIL'lerin en çok izlendiği 2-4 büyük büyütme alanı değerlendirilip ortalaması alınarak, 1 büyük büyütme alanına düşen sayı olarak kaydedildi.

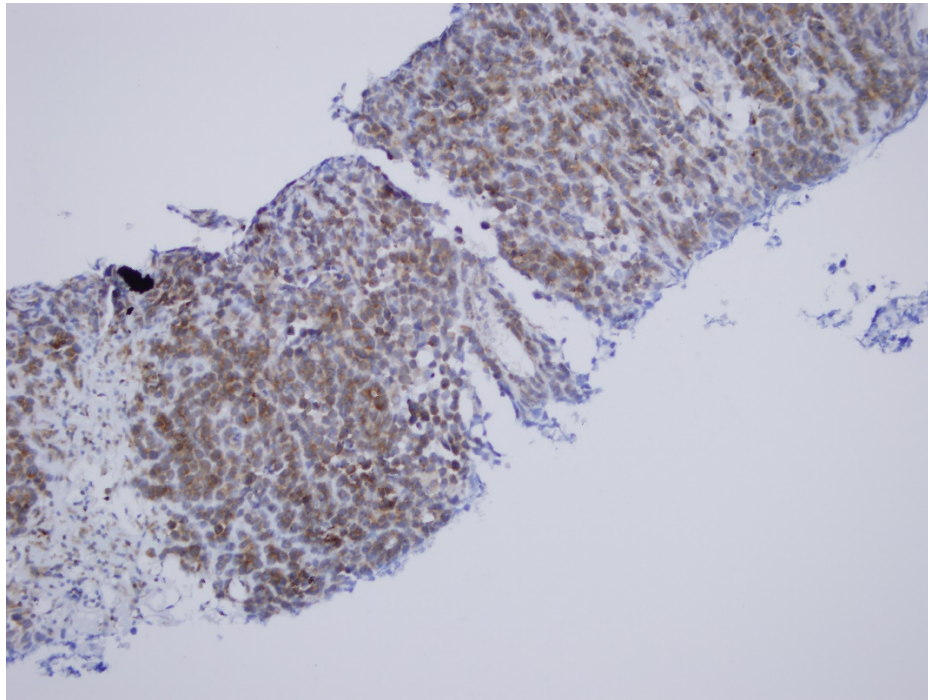
EBV'ye ait immünohistokimyasal çalışma ve EBER In Situ Hibridizasyon çalışma sonuçları değerlendirildi. Güncel DSÖ kriterlerine göre CD5 ve CD30 ile tümör hücrelerinde %1'in üzerindeki ekspresyon pozitif kabul edilirken, Bcl-2 için %50, C-myc için %40'ın üzerindeki ekspresyon pozitif kabul edildi. EBV için, 2017 DSÖ kitabında belirtildiği üzere tümör hücrelerinin çoğunluğunda boyanma olması pozitif kabul edildi.



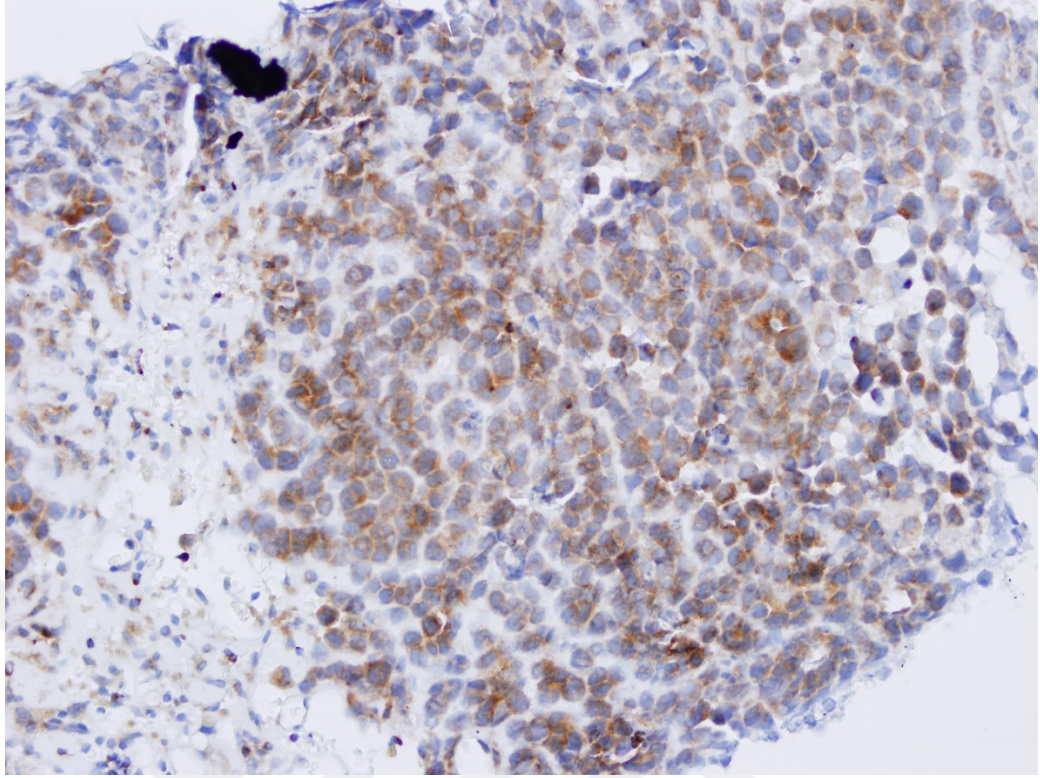
Şekil 9: DBBHL olgusuna ait Hematoksilen&Eozin boyalı kesit(A) ve LAG-3 immünohistokimyasal çalışması uygulanmış kesit(B) (200x)



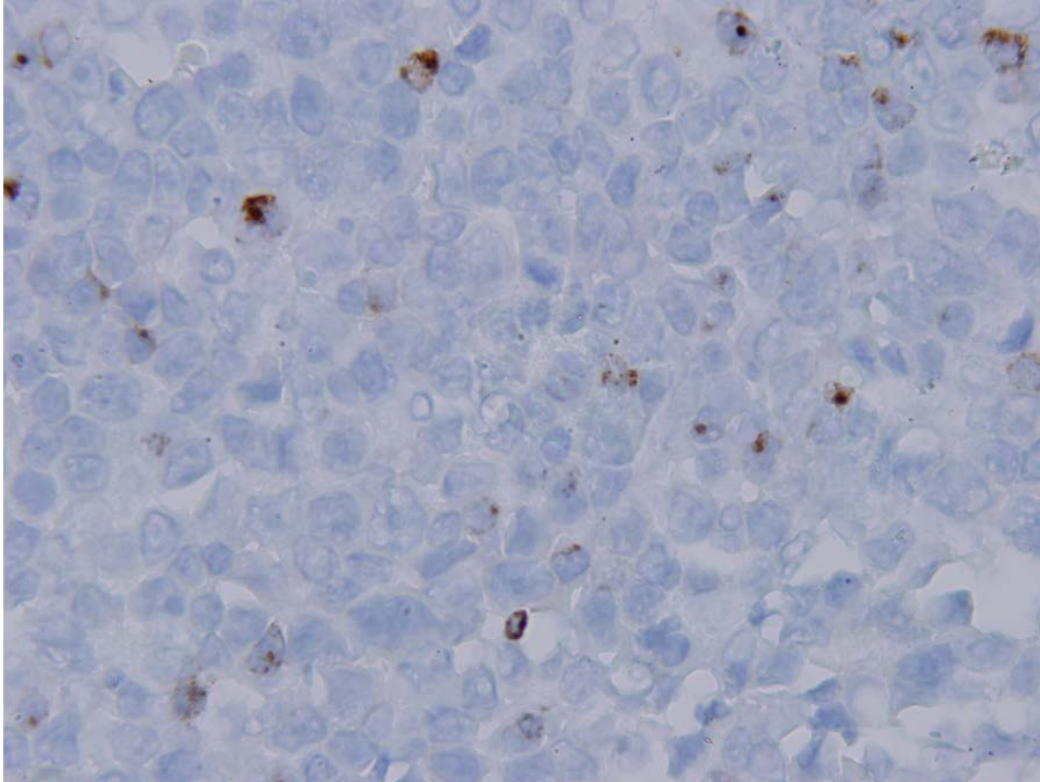
Şekil 10: LAG-3 immünohistokimyası uygulanmış DBBHL dokusu. Tümör hücrelerinde ve TILs'te golgi paterninde ekspresyon (sırasıyla sarı ve kırmızı oklar) ve tümör hücresinde sitoplazmik membranöz ekspresyon (yeşil ok) izleniyor. (1000x)



Şekil 11-A: DBBHL hücrelerinde yaygın ve şiddetli LAG-3 ekspresyonu (400x)



Şekil 11-B: DBBHL hücrelerinde yaygın ve şiddetli LAG-3 ekspresyonu (1000x)



Şekil 12: DBBHL olgusunda tümör hücrelerinde seyrek ve zayıf LAG-3 ekspresyonu (X1000)

Yukarıda tanımlanan bütün değerlendirmeler, hastaların klinik özelliklerinden habersiz olarak, birinci araştırmacı (Dr. E.B.C) ve birinci araştırmadan bağımsız olarak ikinci araştırmacı (Dr.M.D.) tarafından yapıldı ve iki araştırmacının verilerinin ortalaması ile elde edilen sonuçlar istatistiksel değerlendirmede kullanıldı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin analizi IBM SPSS Statistics 17.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) paket programında yapıldı. Kesikli sayısal değişkenlerin dağılımının normale yakın dağılıp dağılmadığı Kolmogorov-Smirnov testiyle incelendi. Tanımlayıcı istatistikler; kesikli sayısal değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma veya medyan (minimum- maksimum) biçiminde ifade edilirken kategorik (nominal ve ordinal) değişkenler olgu sayısı ve (%) şeklinde gösterildi.

Yapılan uyum iyiliği testleri sonucunda parametrik test istatistiği varsayımlarının sağlanmadığı kesikli sayısal değişkenler ile ordinal değişkenler yönünden gruplar arasındaki farkların önemliliği Mann Whitney U testi ile incelendi. 2x2'lik çapraz tablolarda gözelerin en az $\frac{1}{4}$ 'ünde beklenen frekansın 5'in altında olması durumunda söz konusu kategorik veriler Fisher'in kesin sonuçlu olasılık testiyle değerlendirilirken beklenen frekansın 5-25 arasında olduğu durumlarda Süreklilik Düzeltmeli Ki-Kare testi kullanılıp aksi durumlarda Pearson'un Ki-Kare testiyle inceleme yapıldı. Lag-3 TIL, Lag-3 neoplastik hücre yüzdesi ve Lag-3 neoplastik hücre şiddet düzeyleri ile yaş, evre, IPI-7 ve Ki-67 boyanma yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon olup olmadığı ise Spearman'ın sıra sayıları korelasyon testi ile araştırıldı.

LAG-3 TIL, LAG-3 pozitif tümör hücre yüzdesi ve tümördeki LAG-3 şiddetinin ölüm hızı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olup olmadığı tek değişkenli Cox'un oransal hazard regresyon analizi ile incelendi. Her bir değişkene ait rölatif risk (RR) ve %95 güven aralıkları hesaplandı. LAG-3 TIL, LAG-3 pozitif tümör hücre yüzdesi ve tümördeki LAG-3 şiddetine göre oluşturulan gruplar arasında genel sağkalım yönünden farkların önemliliği ise Log-Rank testi kullanılarak Kaplan-Meier sağkalım analizi ile değerlendirildi. Her bir alt grup

içerisinde kaba sağkalım oranları, 1-3 ve 5 yıllık sağkalım hızları ile beklenen ortalama yaşam süresi ve bu süreye ilişkin %95 güven aralıkları hesaplandı. $p<0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

ARAŞTIRMANIN ETİK YÖNÜ

Çalışmanın yürütülebilmesi amacıyla T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 06.02.2019 tarihinde 2019-02/201 karar numaralı etik kurul onayı alındı.

ÇALIŞMA İÇİN İZLENEN KILAVUZ

Çalışma tasarımı için “REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies(REMARK)” araştırma kılavuzu kullanılmıştır(90).

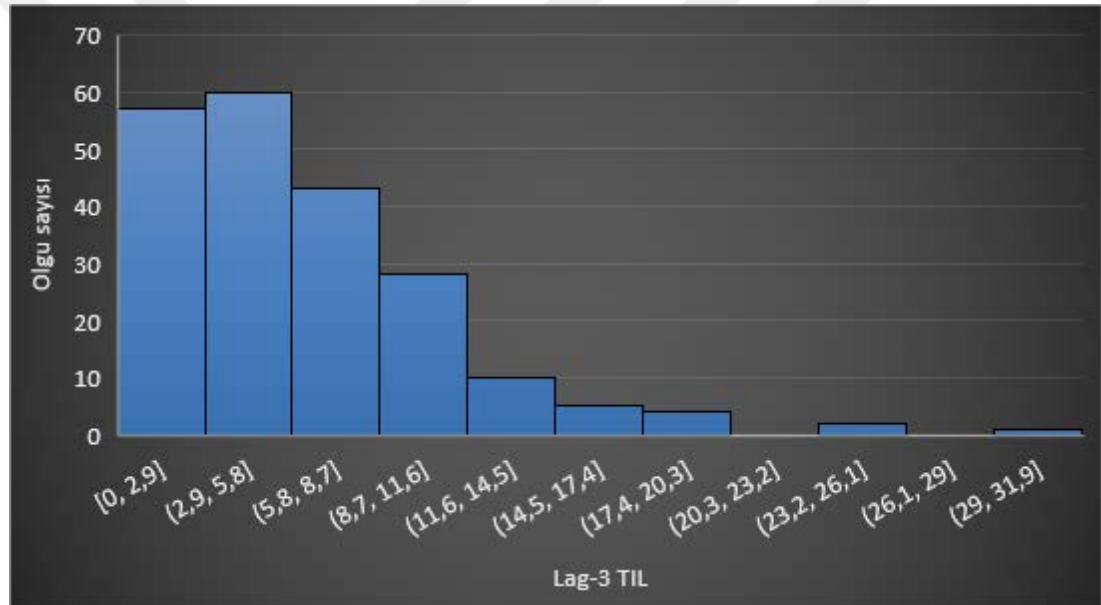
ÖZGÜNLÜK

Çalışmanın özgünlük açısından değerlendirilmesi için “Turnitin” intihal analiz programı kullanılmış olup “Materyal ve Metod” ile “Kaynaklar” bölümü hariç benzerlik indeksi %5 olarak hesaplanmıştır(bkz. EK-4)(91).

BULGULAR

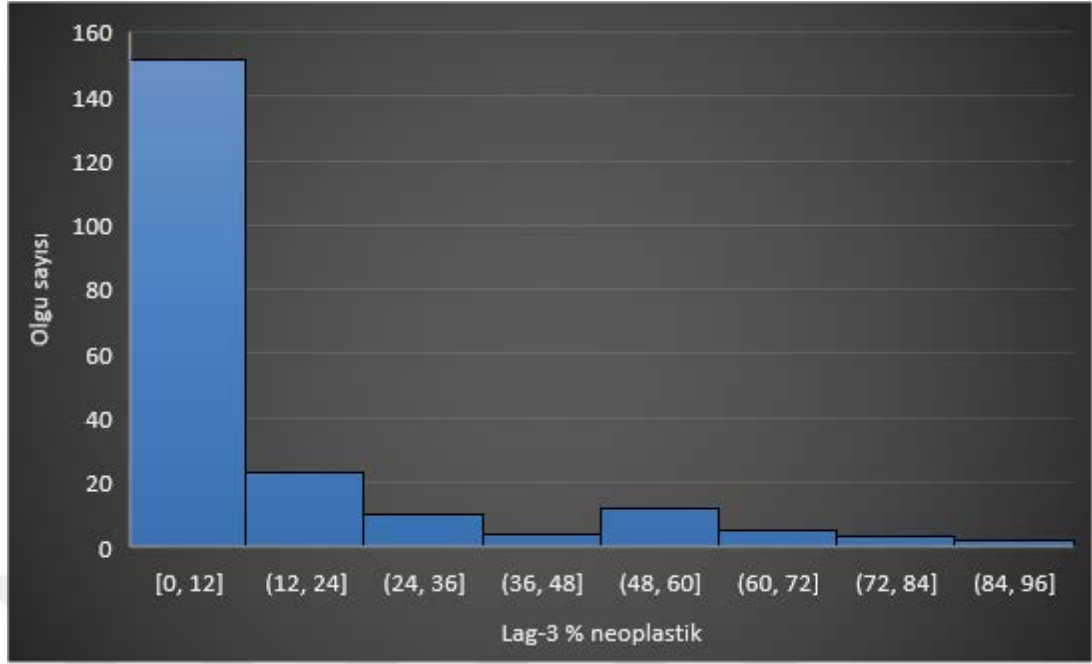
Çalışmaya, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Dr Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezinde 01 Ocak 2007- 01 Eylül 2019 tarihleri arasında tanı almış 210 vaka dahil edildi.

TILs'te LAG-3 eksprese eden olgulara bakıldığında ekspresyon yüzdesinin özellikle %0-10 arasında yoğunlaştığı dikkati çekmektedir ve en yüksek vaka sayısının %2,9-5,8 aralığında olduğu görülmüştür(Şekil 13).

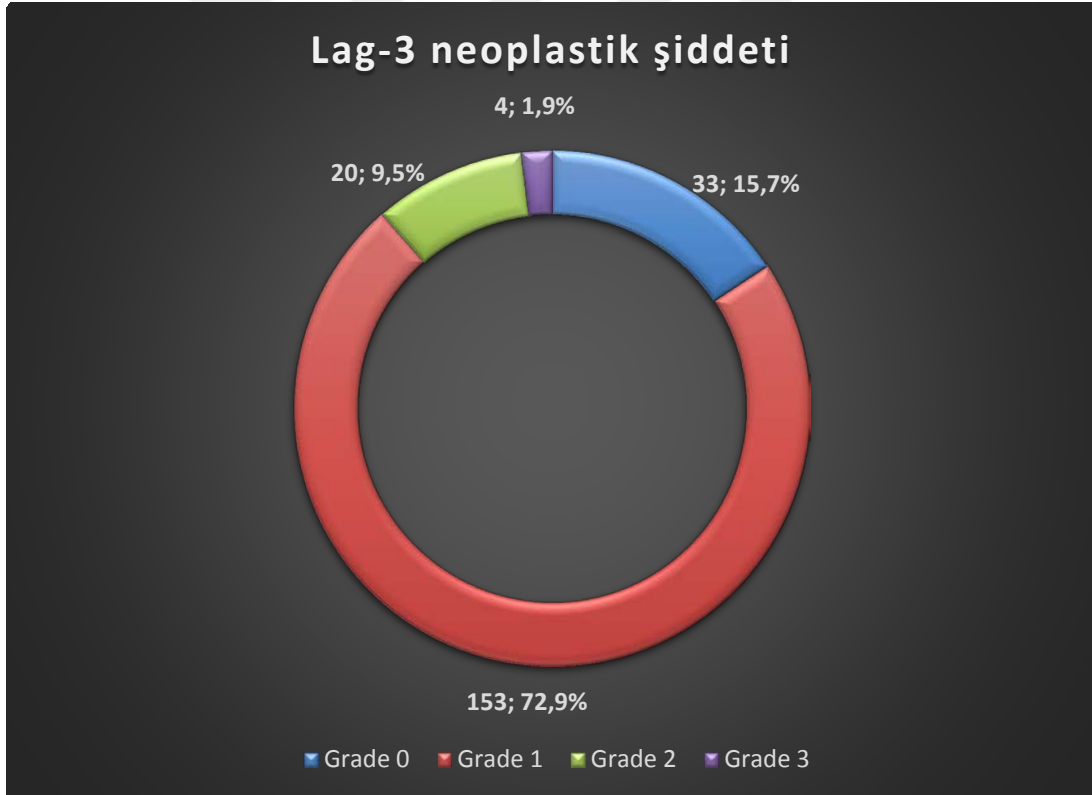


Şekil 13: TILs'te LAG-3 ekspresyonuna göre olgu sayısının dağılımı

Tümöral hücrelerdeki LAG-3 ekspresyon yüzdesinin sonuçlarına baktığımızda vakaların çok büyük bir kısmının, %12 ya da daha az oranda LAG-3 eksprese eden tümöral hücreler içerdiği sonucuna ulaştık (n=145) (Şekil 14). Tümör hücrelerindeki LAG-3 ekspresyonunun şiddetine göre vakaların dağılımını incelediğimizde ise 1 pozitif şiddetindeki vakaların oranının %72,9 ile en baskın grup olduğunu, bu grubu %15,7 ile boyanmayan olguların ve %9,5 ile 2 pozitif şiddetindeki vakaların takip ettiğini gördük. 3 pozitif şiddetindeki vaka oranı ise %1,9 ile en az vakanın izlendiği grubu oluşturmaktaydı (Şekil 15).



Şekil 14: Tümördeki LAG-3 boyanma yüzde aralıklarına göre vakaların dağılımı



Şekil 15: Tümöral dokudaki LAG-3 ekspresyonunun şiddetine (“grade”ine) göre vakaların dağılımı

Çalışmaya dahil edilen olguların yaşı, cinsiyeti, Ann Arbor Evresi, IPI skoru, Ki-67 proliferasyon indeksi, R-CHOP tedavisine yanıtı, olguların takip süresi ve hayatta olup olmadıkları gibi demografik verilerinden elde edilen sonuçlar Tablo 7’de yer almaktadır.

Tablo 7: Çalışmaya dahil edilen olguların demografik ve klinik özellikleri

n=210	
Yaş (yıl)	61,9±14,7
Yaş aralığı (yıl)	18-89
Cinsiyet	
Erkek	102 (%48,6)
Kadın	108 (%51,4)
Ann Arbor Evre	
1	6 (%8,8)
2	12 (%17,6)
3	18 (%26,5)
4	32 (%47,1)
IPI skoru	
0	1 (%1,6)
1	7 (%10,9)
2	14 (%21,9)
3	25 (%39,0)
4	14 (%21,9)
5	3 (%4,7)
Ki-67(%)	80,5 (20,0-100,0)
R-CHOP tedavisine yanıt	
Tam yanıt	48 (%69,6)
Kısmi yanıt	3 (%4,3)
Yanıt yok	18 (%26,1)
Yaşam durumu	
Hayatta	185 (%88,1)
Exitus	25 (%11,9)
Takip süresi (ay)	11,5 (0,13-137,8)

Olguların Bcl-2, c-MYC, CD5, CD30 ve EBER gibi immünohistokimyasal belirteçler yanı sıra tümörde ve TILs'te LAG-3 ekspresyonu ve hücre orijinini belirlemede kullanılan immünohistokimyasal belirteçler ile elde edilen sonuçlara göre vakaların dağılımı tablo 8'de yer almaktadır. Olgularda Bcl-2 antikorunun pozitif olma özelliği baskın görülürken, C-Myc, CD5, CD30 ve EBER belirteçleri için tümöral hücrelerde negatif olma özelliği daha baskın izlenmiştir.

Tablo 8: Çalışmaya dahil edilen olguların patolojik özellikleri

Tanımlayıcı istatistikler	
Bcl-2	
Negatif	43 (%23,8)
Pozitif	138 (%76,2)
C-Myc	
Negatif	27 (%71,1)
Pozitif	11 (%28,9)
Hücre Orijini	
GM dışı fenotip	94 (%52,5)
GM fenotipi	85 (%47,5)
CD-5	
Negatif	114 (%88,4)
Pozitif	15 (%11,6)
CD-30	
Negatif	77 (%75,5)
Pozitif	25 (%24,5)
EBER	
Negatif	62 (%95,4)
Pozitif	3 (%4,6)
LAG-3 TILs	5 (0-30)
LAG-3 tümör-yüzde	6 (0-95)
LAG-3 tümör-şiddet	
0	33 (%15,7)
1	153 (%72,9)
2	20 (%9,5)
3	4 (%1,9)

LAG-3 immünohistokimyasal antikorunun TILs'teki ve tümöral hücrelerdeki (yüzde ve şiddet) ekspresyonunun yaş, Ann Arbor Evresi, IPI skoru ve Ki-67 proliferasyon indeksi yüzdesi ile ilişkisi tablo 9'da gösterilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda TILs'teki LAG-3 ekspresyonu ile sırasıyla; yaş, evre, IPI skoru ve Ki-67 proliferasyon indeksi yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon görülmedi ($p>0,05$). Tümör hücrelerindeki LAG-3 ekspresyon yüzdesi ile sırasıyla; yaş, evre, IPI skoru ve Ki-67 proliferasyon indeksi yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon görülmedi ($p>0,05$). Tümör hücrelerindeki LAG-3 ekspresyon şiddetinin derecesi ile sırasıyla; yaş, Ann Arbor evresi, IPI skoru ve Ki-67 proliferasyon indeksi yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon görülmedi ($p>0,05$) (Tablo 9).

Tablo 9: LAG-3 TILs, Lag-3 tümör hücresi-yüzde ve Lag-3 tümör hücresi-şiddet düzeyleri ile yaş, Ann- Arbor evresi, IPI skoru ve Ki-67 boyanma yüzdesi arasındaki korelasyon katsayıları ve önemlilik düzeyleri

	LAG-3 TILs	LAG-3 tümör-yüzde	LAG-3 tümör-şiddet
Yaş			
Olgu sayısı	210	210	210
Korelasyon katsayısı	0.079	0.071	-0.004
p-değeri †	0.257	0.307	0.952
Ann Arbor Evresi			
Olgu sayısı	68	68	68
Korelasyon katsayısı	-0.035	-0.150	-0.003
p-değeri †	0.777	0.223	0.978
IPI skoru			
Olgu sayısı	64	64	64
Korelasyon katsayısı	-0.064	-0.039	-0.014
p-değeri †	0.613	0.762	0.911
Ki-67 %			
Olgu sayısı	170	170	170
Korelasyon katsayısı	-0.061	0.016	-0.022
p-değeri †	0.433	0.838	0.777

† Spearman'ın sıra sayıları korelasyon testi.

LAG-3'ün tümör hücrelerindeki ekspresyon yüzdesi ve şiddetinin yanı sıra TILs'teki ekspresyonun da incelendiği ve bulguların cinsiyet, tedavi sonu yanıt, Bcl-2, C-Myc, CD5, CD30, hücre orijini ve hastanın sağ kalımı gibi demografik veriler ile ilişkisi tablo 10'da özetlenmiştir.

Cinsiyet, tedavi sonrası yanıt, BCL-2, C-Myc, hücre orijini, CD-5, CD-30 ve mortalite ile LAG-3 TILs düzeylerindeki değişim arasında istatistiksel olarak anlamlı birliktelik görülmedi ($p>0,05$)(Tablo 10).

Kadınlara göre erkeklerde, tümördeki LAG-3 ekspresyon yüzdesi düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek idi ($p=0,039$). Tedavi sonrası yanıt, Bcl-2, C-Myc, Hücre orijini, CD-5, CD-30 ve mortalite ile tümördeki Lag-3 yüzdesi düzeylerindeki değişim arasında istatistiksel olarak anlamlı birliktelik görülmedi ($p>0,05$) (Tablo 10).

Cinsiyet, tedavi sonrası yanıt, BCL-2, C-Myc, hücre orijini, CD-5, CD-30 ve mortalite ile Lag-3 neoplastik şiddetindeki değişim arasında da istatistiksel olarak anlamlı birliktelik görülmedi ($p>0,05$) (Tablo 10).

TILs'teki LAG-3 ekspresyonu ile ölüm hızı arasında istatistiksel olarak anlamlı birliktelik yoktu ($RR=0,944$; %95 Güven Aralığı: 0,861-1,035 ve $p=0,218$). Tümördeki LAG-3 ekspresyon düzeyine göre ölüm hızında istatistiksel olarak anlamlı değişim görülmedi ($RR=1,002$; %95 Güven Aralığı: 0,982-1,022 ve $p=0,856$). LAG-3 neoplastik şiddeti ile ölüm hızı arasında istatistiksel olarak anlamlı birliktelik yoktu ($RR=0,847$; %95 Güven Aralığı: 0,427-1,683 ve $p=0,636$)(Tablo 11).

Tablo 10: Olguların diğer demografik ve klinik özelliklerine göre LAG-3 TILs, Lag-3 tümör-yüzde ve Lag-3 tümör-şiddet düzeyleri

	LAG-3 TILs	LAG-3 tümör-yüzde	LAG-3 tümör-şiddet
Cinsiyet			
Erkek	4,8 (0-30)	8 (0-95)	1 (0-2)
Kadın	5,1 (0-25)	5 (0-95)	1 (0-3)
p-değeri †	0,882	0,039	0,949
Tedavi sonu yanıt			
Tam yanıt var	5,3 (0-25)	5 (0-80)	1 (0-3)
Tam yanıt yok	4 (0-14)	5 (0-80)	1 (0-2)
p-değeri †	0,128	0,995	0,994
BCL-2			
Negatif	5 (0-18,6)	4 (0-95)	1 (0-3)
Pozitif	5 (0-25)	8 (0-95)	1 (0-3)
p-değeri †	0,874	0,057	0,141
C-MYC			
Negatif	3 (0-20)	5 (0-70)	1 (0-3)
Pozitif	3,6 (2-18,6)	10 (1-95)	1 (1-2)
p-değeri †	0,278	0,108	0,408
Hücre orijini			
GM dışı	5 (0-25)	7 (0-95)	1 (0-3)
GM	5 (0-30)	5 (0-95)	1 (0-3)
p-değeri †	0,715	0,289	0,052
CD-5			
Negatif	4,5 (0-25)	7 (0-80)	1 (0-3)
Pozitif	6 (1-18,6)	4 (0-95)	1 (0-1)
p-değeri †	0,542	0,438	0,155
CD-30			
Negatif	5,3 (0-30)	8 (0-95)	1 (0-3)
Pozitif	5,6 (0-13)	5 (0-60)	1 (0-3)
p-değeri †	0,663	0,171	0,676
Yaşam Durumu			
Hayatta	5 (0-30)	7 (0-95)	1 (0-3)
Exitus	4 (0-18,6)	5 (0-80)	1 (0-2)
p-değeri †	0,268	0,315	0,676

Tanımlayıcı istatistikler; medyan (minimum-maksimum) biçiminde gösterildi, † Mann Whitney U testi.

Tablo 11: Genel sağkalımda LAG-3 TILs, tümördeki LAG-3 yüzdesi ve şiddetinin etkilerinin tek değişkenli Cox'un oransal hazard regresyon yöntemi ile incelenmesi

	Rölatif risk	%95 Güven aralığı	p-değeri
Lag-3 TILs	0,944	0,861-1,035	0,218
Lag-3 tümör-yüzde	1,002	0,982-1,022	0,856
Lag-3 % tümör-şiddet	0,847	0,427-1,683	0,636

TILs'teki LAG-3 ekspresyon durumuna göre oluşturulan grupların yaş, cinsiyet, Ann Arbor Evresi, IPI skoru, tedaviye yanıt durumu, hastanın sağ kalımı, hücre orijini gibi demografik veriler ile Ki-67 proliferasyon indeksi yüzdesi, Bcl-2, C-Myc, CD5 ve CD30 immünohistokimyasal antikorları ile ilişkisinin değerlendirme sonuçları tablo 12'de yer almaktadır.

Tüm olgular içerisinde TILs'te LAG-3 ekspresyonunun medyan değeri 5 olarak tespit edildiğinden olgular LAG-3 TILs düzeyi 5 ve altında olanlar ile LAG-3 TILs düzeyi 5'in üzerinde olanlar biçiminde iki gruba ayrılarak kıyaslama yapıldı(Tablo 12).

LAG-3 TILs $\leq$ 5 olan grup ile LAG-3 TILs $>$ 5 olan grup arasında sırasıyla; yaş, cinsiyet, evre, IPI, Ki-67 boyanma yüzdesi, tedavi sonrası yanıt, mortalite, Bcl-2, C-Myc, Hücre orijini, CD-5 ve CD-30 yönünden istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir farklılık görülmedi ($p>0,05$)(Tablo 12).

Tablo 12: LAG-3 TILs düzeylerine göre olguların demografik ve klinik özellikleri

	LAG-3 TILs ≤5	Lag-3 TILs >5	p-değeri
Yaş (yıl)	63 (24-87)	66 (18-89)	0,193†
Cinsiyet			0,570‡
Erkek	55 (%50,5)	47 (%46,5)	
Kadın	54 (%49,5)	54 (%53,5)	
Ann Arbor Evresi	3 (1-4)	3 (1-4)	0,927†
IPI skoru	3 (0-5)	3 (1-4)	0,736†
Ki-67 %	86,5 (20-100)	80 (30-100)	0,348†
Tedaviye tam yanıt			0,657¶
Var	23 (%65,7)	25 (%73,5)	
Yok	12 (%34,3)	9 (%26,5)	
Yaşam durumu			0,823¶
Hayatta	95 (%87,2)	90 (%89,1)	
Exitus	14 (%2,8)	11 (%10,9)	
Bcl-2			0,887¶
Negatif	23 (%24,7)	20 (%22,7)	
Pozitif	70 (%75,3)	68 (%77,3)	
C-Myc			0,722\$
Negatif	17 (%73,9)	10 (%66,7)	
Pozitif	6 (%26,1)	5 (%33,3)	
Hücre Orijini			0,925‡
GM dışı	48 (%52,2)	46 (%52,9)	
GM	44 (%47,8)	41 (%47,1)	
CD-5			0,724¶
Negatif	63 (%90,0)	51 (%86,4)	
Pozitif	7 (%10,0)	8 (%13,6)	
CD-30			0,814¶
Negatif	38 (%77,6)	39 (%73,6)	
Pozitif	11 (%22,4)	14 (%26,4)	

† Mann Whitney U testi, ‡ Pearson'un Ki-Kare testi, ¶ Süreklilik düzeltilmeli Ki-Kare testi, \$ Fisher'in kesin sonuçlu olasılık testi.

Tümördeki LAG-3 ekspresyon durumuna göre oluşturulan grupların yaş, cinsiyet, evre, IPI skoru, tedaviye yanıt durumu, hastanın sağ kalımı, hücre orijini gibi demografik veriler ile Ki-67 proliferasyon indeksi yüzdesi, Bcl-2, C-Myc, CD5

ve CD30 immünohistokimyasal antikorları ile ilişkisinin değerlendirme sonuçları tablo 13 ve tablo 14’te yer almaktadır.

Tablo 13: Lag-3 tümör yüzdesi düzeylerine göre olguların demografik ve klinik özellikleri

	LAG-3 tümör yüzdesi ≤6	LAG-3 tümör yüzdesi >6	p-değeri
Yaş (yıl)	62 (24-89)	66,5 (18-89)	0,240†
Cinsiyet			0,009‡
Erkek	42 (%39,6)	60 (%57,7)	
Kadın	64 (%60,4)	44 (%42,3)	
Evre	4 (1-4)	3 (1-4)	0,229†
IPI skoru	3 (0-5)	3 (1-4)	0,926†
Ki-67 %	80 (20-100)	85 (30-100)	0,980†
Tedavi sonu tam yanıt			0,824¶
Var	29 (%67,4)	19 (%73,1)	
Yok	14 (%32,6)	7 (%26,9)	
Yaşam durumu			0,220¶
Hayatta	90 (%84,9)	95 (%91,3)	
Exitus	16 (%15,1)	9 (%8,7)	
Bcl-2			0,108¶
Negatif	26 (%29,5)	17 (%18,3)	
Pozitif	62 (%70,5)	76 (%81,7)	
C-Myc			0,836¶
Negatif	15 (%75,0)	12 (%66,7)	
Pozitif	5 (%25,0)	6 (%33,3)	
Hücre Orijini			0,489‡
GM dışı	46 (%50,0)	48 (%55,2)	
GM	46 (%50,0)	39 (%44,8)	
CD-5			0,286¶
Negatif	55 (%84,6)	59 (%92,2)	
Pozitif	10 (%15,4)	5 (%7,8)	
CD-30			0,566¶
Negatif	36 (%72,0)	41 (%78,8)	
Pozitif	14 (%28,0)	11 (%21,2)	

† Mann Whitney U testi, ‡ Pearson’un Ki-Kare testi, ¶ Süreklilik düzeltilmeli Ki-Kare testi, \$ Fisher’in kesin sonuçlu olasılık testi.

Tüm olgular içerisinde tümörde LAG-3 ekspresyon yüzdesinin medyan değeri %6 olarak tespit edildiğinden olgular 6 ve daha düşük olanlar ile 6'nın üzerinde olanlar biçiminde iki gruba ayrılarak kıyaslama yapıldı(Tablo 13).

LAG-3 tümör yüzdesi $\leq$ 6 olan grup ile LAG-3 tümör yüzdesi $>$ 6 olan grup arasında sırasıyla; yaş, evre, IPI skoru, Ki-67 boyanma yüzdesi, tedavi sonrası yanıt, mortalite, Bcl-2, C-Myc, Hücre orijini, CD-5 ve CD-30 yönünden istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir farklılık görülmedi ($p>0,05$). Buna karşın LAG-3 tümör yüzdesi $\leq$ 6 olan gruba göre LAG-3 tümör yüzdesi $>$ 6 olan grupta erkeklerin oranı istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek, kadınların oranı ise istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktü ($p=0,039$)(Tablo 13).

Olgular LAG-3'ün neoplastik hücrelerdeki ekspresyon şiddeti 0 olanlar ile şiddeti 1-2-3 olanlar biçiminde iki gruba ayrılarak kıyaslama yapıldı(Tablo 14). Şiddeti 0 olan grup ile şiddeti 1-2-3 olan grup arasında sırasıyla; yaş, cinsiyet, evre, IPI-7, Ki-67 boyanma yüzdesi, tedavi sonrası yanıt, mortalite, Bcl-2, C-Myc, Hücre orijini, CD-5 ve CD-30 yönünden istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir farklılık görülmedi ($p>0,05$)(Tablo 14).

Tablo 14: LAG-3 tümör şiddeti derecesine göre olguların demografik ve klinik özellikleri

	Şiddet = 0	Şiddet = 1-2-3	p-değeri
Yaş (yıl)	62 (36-84)	65 (18-89)	0,301†
Cinsiyet			0,562‡
Erkek	14 (%42,4)	88 (%49,7)	
Kadın	19 (%57,6)	89 (%50,3)	
Ann Arbor Evresi	4 (1-4)	3 (1-4)	0,588†
IPI skoru	3 (1-5)	3 (0-5)	0,928†
Ki-67 %	82,5 (20-95)	80,5 (30-100)	0,814†
Tedavi sonu tam yanıt			0,761¶
Var	10 (%66,7)	38 (%70,4)	
Yok	5 (%33,3)	16 (%29,6)	
Yaşam durumu			0,559¶
Hayatta	28 (%84,8)	157 (%88,7)	
Exitus	5 (%15,2)	20 (%11,3)	
Bcl-2			0,307‡
Negatif	9 (%33,3)	34 (%22,1)	
Pozitif	18 (%66,7)	120 (%77,9)	
C-Myc			0,154¶
Negatif	6 (%100,0)	21 (%65,6)	
Pozitif	0 (%0,0)	11 (%34,4)	
Hücre Orijini			0,192‡
Germinal merkez dışı	12 (%40,0)	82 (%55,0)	
Germinal merkez	18 (%60,0)	67 (%45,0)	
CD-5			0,478¶
Negatif	20 (%83,3)	94 (%89,5)	
Pozitif	4 (%16,7)	11 (%10,5)	
CD-30			0,758¶
Negatif	12 (%70,6)	65 (%76,5)	
Pozitif	5 (%29,4)	20 (%23,5)	

† Mann Whitney U testi, ‡ Süreklilik düzeltilmeli Ki-Kare testi, ¶ Fisher'in kesin sonuçlu olasılık testi.

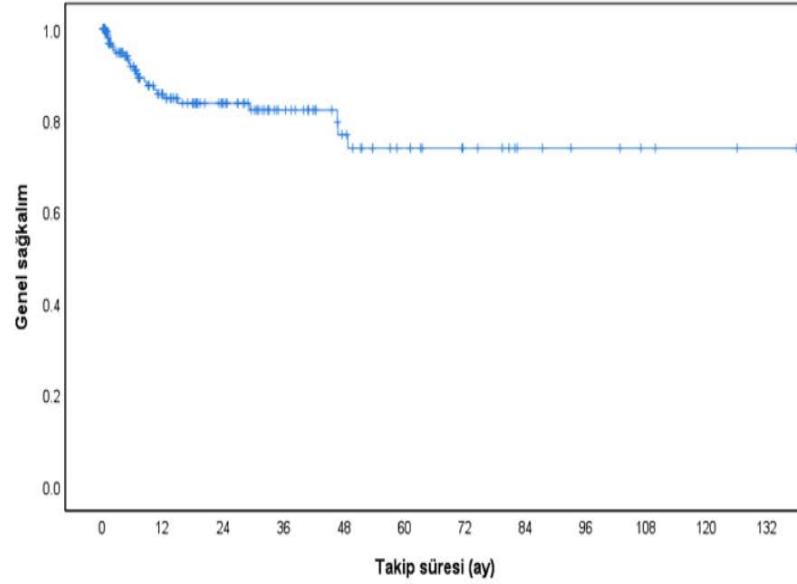
LAG-3 TILs $\leq$ 5 olan grup ile LAG-3 TILs $>$ 5 olan grup arasında genel sağ kalım düzeyleri istatistiksel olarak benzer idi (p=0,493). Tümördeki LAG-3 yüzdesi $\leq$ %6 olan grup ile tümördeki LAG-3 yüzdesi $>$ %6 olan grup arasında genel sağ kalım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p=0,310). Tümör hücrelerindeki LAG-3 boyanma şiddeti 0 olan grup ile 1-2-3 olan grup arasında da genel sağ kalım düzeyleri istatistiksel olarak benzer idi (p=0,626) (Tablo 15).

Tablo 15: Genel sağ kalım üzerinde LAG-3 TILs, tümördeki LAG-3 yüzdesi ve tümördeki LAG-3 şiddetinin etkilerinin incelenmesi

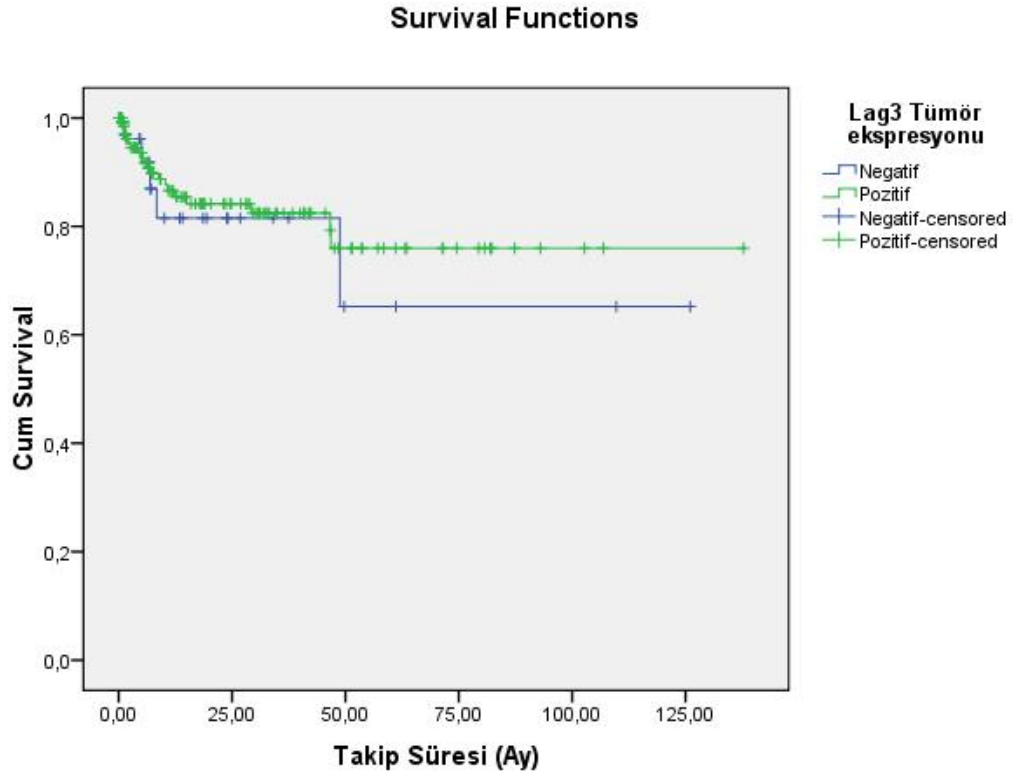
	Olgu sayısı (N)	Hayatta kalan (n)	Kaba sağ kalım *	Sağ kalım hızları (%)			Beklenen yaşam süresi **	Log-rank	p-değeri
				1 yıllık	3 yıllık	5 yıllık			
LAG-3-TIL								0,470	0,493
$\leq$ 5	96	82	85,4	33,0	77,6	71,1	95,1(79,7-110,4)		
$>$ 5	88	77	87,5	88,5	86,6	76,7	111,1(95,6-126,6)		
LAG-3 tümör yüzdesi								1,032	0,310
$\leq$ 6	97	81	83,5	84,9	80,3	64,7	90,8(74,7-106,8)		
$>$ 6	87	78	89,7	86,6	84,5	84,5	117,4(105,0-129,9)		
LAG-3 % tümör şiddeti								0,237	0,626
0	29	24	82,8	81,5	81,5	65,2	91,2 (63,1-119,3)		
1-2-3	155	135	87,1	86,6	82,4	76,0	109,3 (97,2-121,4)		
Genel	184	159	86,4	85,7	82,2	73,9	107,2 (95,4-118,7)	-	-

* Hayatta kalan (n) / toplam olgu sayısı (N) oranı ile (%) olarak hesaplandı, ** Veriler; ortalama (%95 Güven aralığı) şeklinde verilmiştir.

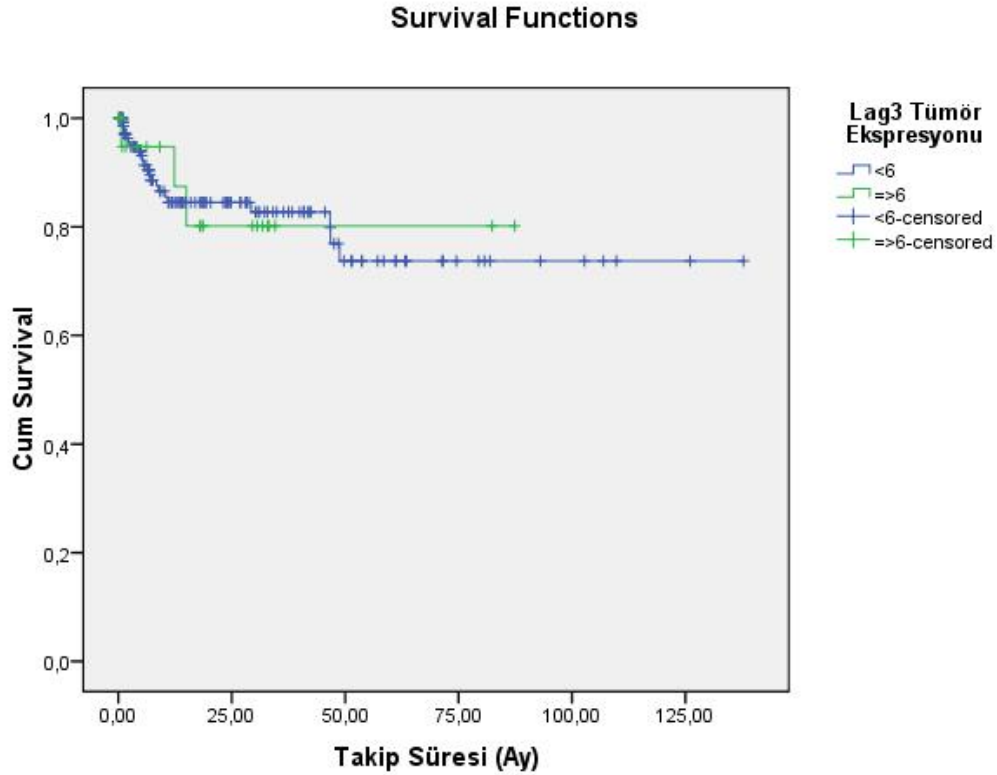
Tüm olgular içerisinde kaba sağkalım oranı %86,4 idi. 1-3 ve 5 yıllık sağ kalım hızları ise sırasıyla; %85,7-%82,2 ve %73,9 olarak tespit edildi. Ortalama beklenen yaşam süresi 107,2 ay (%95 Güven Aralığı: 95,4-118,7) idi (Şekil 16) (Tablo 15). Tümör hücrelerinde LAG-3 ekspresyonu gösteren olgular ile LAG-3 ekspresyonu izlenmeyen olguların sağkalım grafiği şekil 17’de; ayrıca tümör hücrelerinde LAG-3 ekspresyonu %6’nın üzerinde ve %6 ve altında olan olguların sağ kalım grafiği de şekil 18’de görülmektedir.



Şekil 16: Genel sağ kalım yüzdesi ile takip süresi korelasyonu



Şekil 17: Tümör hücrelerinde LAG-3 ekspresyonu gösteren olgular (yeşil çizgi) ile negatif izlenen olguların (mavi çizgi) sağ kalım grafiği



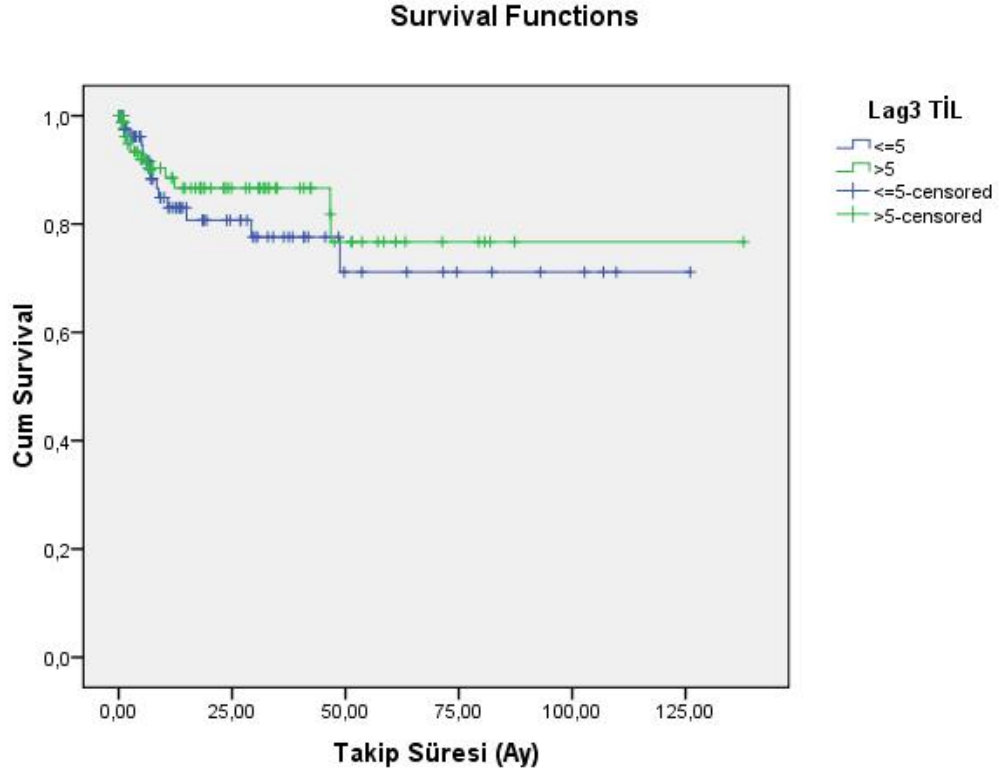
Şekil 18: Tümör hücrelerinde LAG-3 ekspresyonu %6 ve üzerinde (yeşil çizgi) ve %6'nın altında (mavi çizgi) olan olguların sağ kalım grafiği

Tablo 16: LAG-3 pozitif TILs'ın sayısı ve Lag-3'ün tümör hücrelerindeki ekspresyon şiddetinin çapraz olarak değerlendirilmesi

	LAG-3 Tümör şiddeti		Total
	0-1	2-3	
Lag-3 TILs≤5	102	7	109
Lag-3 TILs>5	84	17	101
Total	186	24	210

Tümörde pozitif TILs sayısı ve LAG-3'ün tümör hücrelerindeki ekspresyon şiddeti çapraz olarak değerlendirildiğinde; LAG-3 eksprese eden TILs sayısının 5'in üzerinde izlendiği vakalarda, tümör hücrelerindeki LAG-3 ekspresyon şiddetinin anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü ($p<0,05$) (0.018) (Pearson'ın ki-kare

testi)(Tablo 16). LAG-3 pozitif TILs sayısı 5'in altında ve üstünde olan olguların sağ kalımlarının karşılaştırılması şekil 19'da görülmektedir.



Şekil 19: LAG-3 pozitif TILs sayısı 5 ve altında ve üstünde olan olguların sağ kalımlarının karşılaştırılması

TARTIŞMA

Hodgkin dışı lenfomalar arasında en sık görülen lenfoma türü Diffüz büyük B hücreli lenfomadır ve insidans oranı %6,3'tür(1). DBBHL, dünya çapında, farklı coğrafik bölgelerde farklı görülme sıklıkları bulunmakla beraber, Hodgkin dışı lenfoma olgularının %30-40'ını oluşturmaktadır. Hastalar genellikle hızlı büyüyen, tek ya da multipl olarak izlenebilen, nodal veya ektranodal tümör kitlesi ile başvuruda bulunmaktadır(27).

DBBHL olguları, benign histiyosit nukleusundan daha iri görünümde, diffüz paternde infiltrasyon gösteren B lenfosit kökenli tümör hücrelerinden oluşan bir antitedir(92). Hücre kökenine göre germinal merkez ve germinal merkez dışı fenotip olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır(15). Bunun dışında, CD5 ekspresyonu, Myc ve Bcl-2 ikili ekspresyonu gibi prognozu olumsuz yönde etkileyen faktörler de bulunmaktadır(14).

DBBHL'ler, hastalığın klinik özellikleri ve sağkalım açısından farklılıklar gözlenebilen heterojen bir hastalık grubu olup standart tedavi rejimi olan R-CHOP (rituksimab+siklofosfamid, doksorubisin, vinkristin, prednizon) tedavisine yanıtlar bakımından da farklılıklar göstermektedir(93). Germinal merkez fenotipinin bu tedaviye daha iyi, germinal merkez dışı fenotipin ise daha kötü yanıt verdiği bilinmektedir(92).

Olguların prognozunu öngörmede Uluslararası Prognostik İndeks (IPI) kullanılmakta olup bu indeks, genel kabul edilmiş bir sistem olmakla birlikte yine de sağkalımı tahmin etmede yetersiz kaldığı farkedilmiş ve yeni prognostik belirteçlerin araştırılması yoluna gidilmiştir(3).

Günümüzde, tümör gelişimi ve progresyonunda tümör mikroçevresinin önemli bir yeri olduğu ortaya konmuştur. Tümör hücrelerinin, mikroçevredeki bağışıklık hücrelerinin çalışmasını artırıcı ve azaltıcı sinyaller üretebildiği gösterilmiştir. Özellikle T hücre faaliyetleri, tümöre yanıtta anahtar rol üstlenirler. Neoplastik hücrelerin, sitotoksik T-lenfosit ilişkili antijen-4 (CTLA-4), programlı ölüm reseptörü-1 (PD-1), programlı ölüm reseptörlerinin ligandları (PDL1/PDL2)

gibi immün kontrol noktası reseptörlerine bağlanarak, bağışıklık yanıtından kaçtıkları belirlenmiştir(94).

LAG-3 molekülünün de bir kontrol noktası reseptörü olduğu ve aşırı immün aktivasyonun engellenmesinde ve otoimmüniteden korunmada gerekli olduğu bilinmektedir(5). LAG-3'ün, CD4, CD8 T hücreleri, B hücreleri, NK hücreleri ve plazmasitoid dendritik hücrelerin yüzeyinde eksprese edilip, Class II MHC molekülüne bağlandığı ve negatif düzenleyici rol oynayarak T hücre fonksiyonunu baskıladığı düşünülmektedir(6). Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, folliküler lenfoma ve meme kanseri gibi tümörlerde, tümör infiltrate eden lenfositlerde, LAG-3 ekspresyonunun genel sağkalım üzerine olumsuz etkisi bulunduğunu düşündüren çalışmalar mevcuttur(7). Diffüz büyük B hücreli lenfomada ise LAG-3 ekspresyonunun immün kaçış stratejilerinden birisi olduğunu gösteren birtakım çalışmalar bulunmaktadır ancak daha geniş araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır(8).

Bu çalışmada, DBBHL olgularında, neoplastik hücrelerde ve tümörü infiltrate eden lenfositlerde LAG-3 ekspresyonunu immünohistokimyasal olarak değerlendirmeyi ve patolojik ve klinik parametreler ile ilişkisini incelemeyi amaçladık. Patolojik parametreler içerisinde hücre orijini, Ki67 proliferatif aktivite indeksi, Bcl-2, C-Myc, CD5 ve CD30 ekspresyonu bulunmakta olup klinik veriler arasında hastanın yaşı, cinsiyeti, IPI skoru, tedaviye yanıt derecesi ve sağkalım süresi bulunmaktadır.

Çalışmaya dahil edilen olguların demografik ve klinik özelliklerine bakıldığında (Tablo 7); olgularımızın yaş aralığı 18-89 olarak bulundu. Literatürde, Uluslararası Lenfoma Çalışma Grubu'nun Hodgkin dışı lenfoma sınıflaması projesine göre, DBBHL'nin median yaşı 7. dekad olmakla birlikte sıklıkla genç erişkinlerde ve nadiren çocuklarda görülebileceği bildirilmiştir(23). Çalışmamızda, merkezimizde çocuk onkoloji servisinin bulunmaması nedeniyle pediatrik vakalar bulunmamaktadır. Ancak 18 yaşından büyük olgulardaki görülme yaşı, literatür ile uyumluluk göstermektedir.

Çalışmamızda, her iki cinsiyetteki DBBHL görülme sıklığı arasında anlamlı bir farklılık izlenmemekle birlikte, %1,8 oranında bir fark ile hafif kadın üstünlüğü izlendi. Bu sonuçlar, Uluslararası Lenfoma Çalışma Grubu'nun sonuçlarına yakındır

ancak, çalışma grubu, DBBHL'nin erkeklerde kısmen daha çok görüldüğünü bildirmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hastalardan 68 hastanın Ann Arbor Evre bilgisine ulaşılabilmiş olup, hastaların daha çok evre 4 (32 hasta), ve ikinci sıklıkta evre 3 (18 hasta) hastalık ile başvurduğu gözlemlendi. Tanı anında 50 hasta ileri evre hastalık, 18 hasta ise sınırlı hastalık ile prezente olmuştu. Bu da, literatürde yer alan, hastaların büyük bir kısmının tanı anında ileri evre hastalık ile başvurduğu bilgisiyle örtüşmektedir(95).

Olguların IPI skoruna göre dağılımına bakıldığında; en çok sayıda hasta skor 3 grubunda yer alırken, en az sayıda hasta skor 1 ve skor 5 grubunda yer almaktaydı. Zheng ve arkadaşlarının 2014 yılında yapmış olduğu çalışmada da, farklı kohort gruplarında, IPI skoru dağılımı bakımından çalışmamızdakine benzer şekilde en çok hasta sayısı IPI skor 2,3 ve 4'te bulunmuştur(3).

Olguların, Ki-67 proliferatif aktivite indeksi %20 ile %100 arasında değişmekle birlikte ortalama %80,5 bulundu. Hasselblom ve arkadaşlarının Ki-67'nin DBBHL olgularında prognostik etkiyi araştırdığı bir çalışmada da çalışmamızdakine benzer değerler bulunmuştur(96).

Olgularımızın 48 tanesi (%69,6), R-CHOP tedavisine tam yanıt verirken, 3'ü (%4,3) kısmi yanıt vermişti. 18 olguda (%26,1) ise yanıt izlenmemiştir. Costa ve ark. yaptığı bir çalışmada, DBBHL olgularında, R-CHOP tedavisine %43 vakada tam yanıt, %27 vakada kısmi yanıt gözlenirken, %30 vaka ise yanıtız olarak saptanmıştır(97). Bir başka çalışmada ise, DBBHL olgularında aynı tedavi rejimine; %60 olguda tam yanıt, %5 olguda parsiyel yanıt, %20 olguda relapslar ile gidiş gözlenmiş ve %15 olguda primer yanıtızlık gözlenmiştir(98). Görüldüğü gibi, tedaviye yanıtlar konusunda merkezler arasında farklılıklar bulunmakla birlikte, çalışmamızda olduğu gibi, sıklıkla vakaların çoğunluğunda tam yanıt izlenirken, daha az oranda yanıtız olgular ve en az oranda parsiyel yanıt gösteren olgular görülmektedir.

210 adet olgunun 25 tanesinin hayatta olmadığı verisine ulaşılmış olup, ortalama takip süreleri 11,5 ay olarak hesaplandı. Tüm olgular içinde kaba sağkalım oranı %86,4 idi. 1-3 ve 5 yıllık sağkalım hızları ise sırasıyla; %85,7-%82,2 ve %73,9

olarak tespit edildi. Ortalama beklenen yaşam süresi 107,2 ay (%95 güven Aralığı: 95,4-118,7) idi.

LAG-3 TIL sayı aralıklarındaki olgu sayısının dağılımına bakıldığında (Şekil 13); Bir büyük büyütme alanı başına 3-6 adet LAG-3 pozitif TIL içeren olguların, yaklaşık 60 olgu ile en kalabalık grup olduğunu, bunu da yaklaşık 56 adet olguyla, 0-3 TIL içeren grubun takip ettiğini gördük. Kalan vakalarda ise en çok 6-9 TIL içerenler 40'a yakın bir sayıyla başta olmak üzere, giderek azalan oranlarda vakaların dağıldığını görmüş olup 29-32 TIL içeren grupta en az sayıda olgu izledik. Çalışmamızda LAG-3 pozitif TIL'lerin median değerini ise 5 bulduk. Chen ve ark. yaptığı benzer bir çalışmada ise DBBHL olgularında LAG3 pozitif TIL sayısı büyük büyütme alanı başına 0-200 arasında değişmekle birlikte ortalama değer 46,1 olarak hesaplanmıştır(89). Bu değerler, bizim değerlerimizin üstünde olmakla birlikte, Chen ve ark. çalışmasında, fare kökenli anti-LAG-3 antikoru kullanılırken, çalışmamızda tavşan bazlı LAG-3 antikoru kullanmamıza bağlı ve değişen mikroskop görüntü alan çapına göre sayısal değişikliklerin ortaya çıkmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında yapılan bir çalışmada, LAG-3 pozitif TIL değerleri numerik değerler yerine yüzde olarak değerlendirilmiş olup %20'nin üzeri pozitif olarak kabul edilmiştir(78). Burugu ve ark.'nın üçlü negatif meme karsinomlarındaki LAG-3 ekspresyonunu araştırdığı çalışmada ise, tümör infiltre eden lenfositler, memedeki mevcut kılavuzlara göre değerlendirilerek, LAG-3 pozitif intratümöral lenfosit değerleri yüzdelik olarak hesaplanmış olup %1'in üzeri pozitif kabul edilmiştir(99). Mevcut çalışmamızdaki lenfosit sayısına göre oldukça düşük olan bu sayının, memede tümörü infiltre eden lenfositler stromal ve intratümöral olmak üzere kılavuzlarca ikiye ayrılarak değerlendirilmesine ve intratümöral lenfosit sayısının stromal olanlara göre, görece daha az olmasına bağlamaktayız.

Tümör hücrelerindeki LAG-3 boyanma yüzdelerine ve şiddetlerine bakıldığında (Şekil 14-15); çalışmamızda şaşırtıcı bir şekilde, DBBHL hücrelerinde LAG-3 ekspresyonu gözlemledik. 177 olguda 1-2-3 şiddetinde boyanma izlenirken, 33 olguda boyanma izlenmedi. LAG-3 boyanan tümör hücresi yüzdesine bakıldığında, median değeri %6 olarak hesapladık. Kesme değeri %10 ve üzeri

olarak aldığımızda, 82 adet (%39) olguda tümör hücrelerinde LAG-3 pozitifliği, 128 olguda (%61) LAG-3 negatifliği gözlemledik.

LAG-3 eksprese eden tümör hücre yüzdesi açısından bakıldığında, olguların dikkat çekici ölçüde büyük bir kısmının (yaklaşık 150 vaka) %0-12 aralığında toplandığını gördük. Bunu oldukça geriden gelerek, %12-24 aralığındaki yaklaşık 20 vakalık grup takip etmekteydi. Diğer vakalar ise %12’lik gruplara bölündüğünde, her bir grubun benzer sayıda (20’den az) olgu içerdiği görüldü.

Literatürdeki daha önceki bilgilere göre, LAG-3 molekülünün inflamatuvar hücrelerde eksprese edildiği bilinmekteydi(59) ve LAG-3 ekspresyonunu meme karsinomları ve küçük hücreli dışı akciğer karsinomları gibi farklı tümörlerde değerlendiren çeşitli çalışmalarda tümör hücrelerinde ekspresyon görülmediği belirtiliyordu(78)(99). Ancak çalışmamızda, DBBHL hücrelerinde sitoplazmik-membranöz ve bazıları golgi paterninde olmak üzere azımsanmayacak oranda (%39) ekspresyon gözlemledik. Bu tez çalışması devam ederken yayınlanan yeni 3 çalışmada, Chen ve ark., Keane ve ark. ve Laurent ve ark. da, çalışmamızdakine benzer şekilde DBBHL hücrelerinde LAG-3 ekspresyonu saptamış durumdadır(89)(100)(8).

Keane ve ark. çalışmasında DBBHL hücrelerinde, LAG-3 ekspresyonu sitoplazmik ve membranöz olarak izlemiş olup 2 farklı merkezden (Prenses Andrea Hastanesi ve MD Anderson Kanseri Merkezi) 2 farklı kohort değerlendirmiş ve tümör hücrelerinin %5’ten fazlasını pozitif kabul ederek kohortlardan birinde %32 oranında diğerinde ise %10 oranında ekspresyon gözlemlemiştir(İlk grubun median değeri %45, ikinci grubun ise %70 olarak hesaplamıştır)(100). Chen ve ark., çalışmamızdakine benzer şekilde %10 ve üzeri tümör hücrelerinde ekspresyonu pozitif kabul ederek olguların %7,7’sinde ekspresyon saptarken, Laurent ve ark. %20 ve üzerini kesme değeri olarak olgularının %85’inde ekspresyon saptamıştır(89)(8). Bu da DBBHL’nin diğer tümörlerden farklı olarak tümör hücrelerinde LAG-3 eksprese ettiğini desteklemektedir.

Kontrol noktası moleküllerinin daha çok immün sistem hücrelerinde eksprese edildiği bilinmekle beraber, yeni ve destekleyici çalışmalar ile birlikte, LAG-3’ün DBBHL olgularında tümör hücrelerinde de eksprese edildiğini ortaya koymuş

bulunmaktayız. Tümör hücrelerindeki bu ekspresyon, hedefe yönelik anti-LAG-3 tedavileri açısından umut vericidir.

Olguların diğer patolojik ve prognostik parametrelerine bakıldığında (Tablo 8); Bcl-2 için, DSÖ 2017 kitabında önerildiği üzere kesme değer %50 olarak alındığında, 43 vakanın (%23,8) Bcl-2 ile negatif, 138 (%76,2) vakanın ise pozitif olduğunu gördük. Shivakumar ve ark. DBBHL olgularıyla yaptığı bir çalışmada ise, Bcl-2 ekspresyonu açısından olguların %66'sını pozitif, %34'ünü negatif olarak tespit etmiştir. Literatürde, farklı klonların kullanımına bağlı olarak olgulardaki Bcl-2 ekspresyonunun %47-84 arasında değiştiği belirtilmektedir(14). Bu da bizim merkezimiz de dahil olmak üzere, farklı merkezlerde farklı oranların gözlenebilme nedenini açıklamaktadır.

C-Myc için, DSÖ 2017 kitabında da belirtildiği üzere kesme değer %40 olarak alındığında olgularımızın %71'inde negatiflik, %29'unda ise pozitiflik izledik. Bu ekspresyon oranları literatürde, DLBCL olgularının yalnızca üçte birinde (%29) C-Myc ekspresyonunun bulunduğu, Johnson ve ark. yaptığı çalışma ile uyumluluk göstermektedir(101).

Hans algoritması kullanarak yapılan hücre orijini sınıflamasına göre, olgularımızın, 94 tanesi (%52,5) germinal merkez dışı fenotip göstermekte iken, 85 tanesi (%47,5) germinal merkez fenotipine sahipti. Literatürde bu oran, coğrafik bölgeler, hasta popülasyonu ve kullanılan metodolojiye göre değişmek ile birlikte, germinal merkez fenotipi için %60, germinal merkez dışı fenotip için ise kabaca %40 olarak belirtilmektedir(102).

Olgularımızdan 114 (%88,4) tanesi CD5 ile negatif, 15 tanesi (%11,6) pozitif. Zijun ve ark. de novo olarak gelişen DBBHL olgularında CD5 ekspresyon oranını, çalışmamızdaki oranın hafif altında (%5,5) bulmuş olup CD5 ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu vurgulamıştır(103).

77 olgumuz (%75,5) CD30 açısından negatifken, 25 olgu (%24,5) ise pozitif. CD30 molekülünün DBBHL olgularındaki prognostik etkisini araştıran bir başka çalışmada, vakaların %14'ü pozitif, %86'sı negatif bulunurken(32), Campuzano-Zuluaga ve ark. çalışmasında ise çalışmamıza benzer şekilde DBBHL olgularının %21'inde CD30 pozitifliği görülmüştür(104).

EBV açısından baktığımızda, %95,4 olguda negatiflik ve %4,6 olguda pozitiflik izlendi. Bu da literatürde yer alan, bilinen immün yetmezliği olmayan DBBHL olgularındaki EBV enfeksiyon oranının batı toplumlarında %3 ve Asyalı ve Latin Amerikalı popülasyonda %10 olduğu bilgisiyle hemen hemen örtüşmektedir(14).

Olgularda, tümörde ve TILs'de LAG-3 ekspresyon durumu ile klinik veriler ve Ki-67 boyanma düzeyleri arasındaki korelasyona bakıldığında (Tablo 9); tümördeki ve tümörü infiltre eden lenfositlerdeki LAG-3 ekspresyonu ile yaş, Ann Arbor evresi, IPI skoru ve Ki-67 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunadı. Feng ve ark., NK/T hücreli lenfomalarda yaptığı bir çalışmada, çalışmamızdakine benzer şekilde, LAG-3 ekspresyonu ile yaş, IPI skoru ve Ann Arbor evresi arasında dikkate değer bir korelasyon bulunmadığını bildirirken(105), Keane ve ark. da, çalışmamızdakine benzer şekilde, DBBHL olgularındaki LAG-3 gen ekspresyonunun IPI ve hücre orijini sınıflaması arasında bir korelasyon bulunmadığını belirtmiştir(100). Ki-67 skoru ile LAG-3 ilişkisinin değerlendirildiği, meme karsinomlarında yapılan bir çalışmada ise, LAG-3 pozitif TILs sayısının yüksek Ki-67 proliferasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur(99) ancak bizim çalışmamızda DBBHL vakalarında benzer bir sonuç görülmedi. Bu farklılığın, meme karsinomları ve lenfoid malignitelerin farklı biyolojik mekanizmalar ile gelişmesi nedeniyle farklı ekspresyon paternleri göstermesine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Olgulardaki TILs ve tümör hücrelerindeki LAG-3 ekspresyonunun diğer demografik ve patolojik özellikler ile ilişkisine bakıldığında (Tablo 10); tümör hücrelerinde eksprese edilen LAG-3 oranlarında erkek ve kadın cinsiyet arasında şaşırtıcı bir şekilde istatistiksel olarak anlamlı farklılık elde edilmiş olup erkek hastalarda tümör hücrelerinde belirgin ölçüde artmış LAG-3 ekspresyonu gözlemlendi($p<0,05$). Bu alanda literatürde daha önceden herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Yalnızca, DBBHL'de genel sağkalım açısından kadın cinsiyetin daha iyi olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur(106). Çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı bulduğumuz bu sonucun literatürde ilk olması açısından çalışmamızın özgün değerini artırdığı görüşündeyiz.

Tedaviye yanıt, Bcl-2, C-myc, CD5, CD30 ekspresyonu ve hücre orijini sınıflaması ile TILs ve tümördeki LAG-3 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulmadık. Keane ve ark. yaptığı çalışmada, çalışmamızda olduğu gibi hücre orijini sınıflaması ve LAG-3 ekspresyon durumu araştırılmış olup çalışmamızla uyumlu olarak bu değerler arasında bir korelasyon izlenmemiştir(100).

LAG-3 pozitif TIL sayısı ile tümör hücrelerindeki LAG- 3 ekspresyon şiddeti çapraz olarak değerlendirildiğinde (tablo 11); olgularda LAG-3 eksprese eden TIL sayısı arttıkça, tümör hücrelerindeki LAG-3 ekspresyon şiddetinin de istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı gözlemlendi ($p<0,05$). LAG-3 eksprese eden TIL sayısının 5'in altında bulunduğu grupta, 7 vakada 2 ve 3 şiddette ekspresyon görülürken, 5'in üstünde bulunduğu grupta 17 vakada 2 ve 3 şiddetinde ekspresyon görüldü.

Daha önceden tümör hücrelerinin LAG-3 eksprese edebildiğine dair herhangi bir kanıt yoktu. Bu tez çalışması yapıldığı sıralarda çıkan 3 yeni yayında önemli ve yeni bir bulgu olarak çalışmamızdakine benzer bir şekilde tümör hücrelerinde LAG-3 ekspresyonu izlenmiştir. LAG-3 pozitif TIL'ler ve tümör hücresindeki LAG-3 şiddetini karşılaştıran bir yayın ise şu anda literatürde bulunmamakta olup istatistiksel olarak anlamlı bulduğumuz bu sonucu, özgün değeri yüksek olduğu için değerli olarak görmekteyiz. Bu durum, LAG-3 eksprese eden tümörü infiltre eden lenfosit sayısı arttığında, tümör hücrelerindeki LAG-3 ekspresyonunun da cevaben artmış olabileceğini akla getirmiş olup bu konuda detaylı yorum yapabilmek için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Tümör infiltre eden lenfositler ve tümör hücrelerindeki LAG-3 ekspresyonunu median değerlere göre iki gruba ayırarak incelediğimizde (tablo 12, 13 ve 14); yaş dağılımı arasında iki grup arasında bir fark görülmemiştir.

Cinsiyet açısından bakıldığında, önceki bulduğumuz değerlere benzer şekilde, erkek cinsiyette, tümör hücrelerinde LAG-3'ü %6'nın üstünde eksprese eden hasta sayısı, LAG-3 ekspresyonu düşük olan hasta sayısına göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha yüksekti($p=0,009$). LAG-3 pozitif TILs'e bakıldığında ise, benzer bir

farklılık görmedik. Bu da erkek cinsiyette, tümör hücrelerindeki LAG-3 ekspresyonunun daha yüksek olduğunu çalışmamızda bir kez daha vurgulamaktadır.

Tedavi yanıtı açısından bakıldığında, tedaviye tam yanıt gösteren vakalarda LAG-3+ TILs'in 5'in üstünde olduğu grupta 25 olgu varken, düşük olduğu grupta 23 olgu izlendi. Tedaviye yanıt göstermeyen vakalar arasında ise, LAG-3+ TILs'in düşük bulunduğu grupta daha fazla sayıda hasta izlendi. Buna benzer şekilde, tümördeki LAG-3 ekspresyonunun %6'nın üstünde bulunduğu grupta hastaların %73,1'i tedaviye tam yanıt verirken, %6 ve altında olduğu grupta yalnızca %67,4 oranında hasta tedaviye tam yanıt vermişti. Bu da LAG-3'ün tedaviye yanıtı daha olumlu yönde etkilediğini düşündürmüş olmakla beraber p değeri 0,825 bulundu. Bu konuda daha önceki yapılan çalışmalarda ise, Keane ve ark. LAG-3'ün çözünebilir formunun kandaki düzeyini araştırmış, LAG-3 seviyesinin düşük oranda izlendiği olguların, R-CHOP tedavisine daha iyi yanıt verdiğini bulmuştur(100). Bu sonuç, kandaki çözünebilir LAG-3 miktarının tedaviye yanıtı olumsuz yönde etkilediğini desteklemekteyken, aksine bizim çalışmamızda dokudaki ekspresyon durumunun yanıtı daha olumlu yönde etkilediğini düşündüren sonuçlar bulunmaktadır. Bu farklılığın, LAG-3'ün kandaki çözünebilir formu ile dokudaki formu arasındaki farklılıktan kaynaklanıyor olabileceğini düşünmekteyiz.

Bcl-2, C-Myc, CD5 ve CD30 ekspresyonu ve hücre orijinine göre sınıflama açısından bakıldığında, LAG3 pozitif TIL sayısı 5'in altında ve üstünde olanlar ile, tümör hücrelerindeki LAG-3 ekspresyonu %6'nın altında ve üstünde olanlar arasında farklılık bulunmadı. Literatürde; Bcl-2, C-myc, ve CD5 ile LAG-3 arasındaki ilişkiyi araştıran çalışma bulunmamakla beraber, Keane ve ark., çalışmamızdakine benzer şekilde DBBHL olgularında LAG-3 gen ekspresyonuyla hücre orijini sınıflaması arasında bir korelasyon bulunmadığını belirtmiştir(100).

Genel sağkalım üzerinde LAG-3 TIL, LAG-3 tümör yüzdesi ve LAG-3 tümör şiddetinin etkilerinin incelenmesine bakıldığında (Tablo 15, Şekil 16-19); tüm olgular içerisinde kaba sağkalım oranını %86,4 olarak saptadık. Tümör hücrelerindeki LAG-3 ekspresyonu %6 ve altında olan olgulardaki kaba sağkalım %83,5 iken, %6 üstünde izlenen olgularda %89,7 olarak izlendi. Benzer şekilde, tümör hücrelerindeki LAG-3 boyanma şiddeti 0 olan olgulardaki kaba sağkalım

%82,8 iken, 1,2 ve 3 şiddetinde boyanan grupta genel sağkalım %87,1 olarak gözlemlendi. Bu da tümördeki LAG-3 ekspresyonunun ve şiddetinin artışının sağkalım üzerine olumlu bir etkisi olabileceğini düşündürmekle birlikte daha çok olguyla ve çalışmayla desteklenmesi gereklidir. Çalışmamız, şu an için literatürde, DBBHL hücrelerinde LAG-3 ekspresyonunun olabildiğini gösteren 4 çalışmadan biridir. Diğer 3 çalışmada ise, tümördeki ekspresyon ve genel sağkalım arasında değerlendirme yapılmamıştır.

LAG-3 eksprese eden TIL sayısı 5'in üstünde olan olgularda kaba sağkalım %87,5 olarak izlenirken, 5'in altındaki olgularda %85,4 olarak izlendi. Bu sonuçlar, artan LAG3+ TILs'in sağkalımı olumlu yönde artırdığını düşündürmekle beraber, istatistiksel olarak anlamlı sonuç için daha çok klinik korelasyona ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürde de bu konuda farklı görüşler bildiren çalışmalar mevcuttur. Keane ve ark.'nın genetik ekspresyon analizlerini kullanarak yaptığı bir çalışmada, DBBHL olgularında yüksek LAG-3 gen sayısı ve yüksek LAG-3 mRNA seviyesi gösteren olgularının daha kötü hastaliksız sağkalım süresine sahip olduğu gösterilmiş olup LAG-3'ün artan gen oranının kötü prognozu öngördüğünü öne sürülmektedir(100). Çalışmamızda genetik analiz yerine immünohistokimyasal ekspresyon yönteminin kullanılması, iki çalışmanın karşılaştırılabilirliğini önemli ölçüde azaltmakta olup farklı çalışma yöntemleri nedeniyle farklı sonuçlar bulunabileceğini düşünmekteyiz.

Que ve ark. yaptığı çalışmada, TILs'deki immünohistokimyasal LAG-3 ekspresyonunu yumuşak doku sarkomlarında araştırmış ve artan LAG-3 ekspresyonunu, kötü klinik gidişat ile korele olarak bulunmuştur(107). Buna karşın, küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında, Datar ve ark., TILs'de belirgin LAG-3 ekspresyonunun izlendiği olgularda daha uzun 5 yıllık genel sağkalım oranı olduğunu ortaya koymuştur(108). Yine aynı şekilde küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında yapılan bir başka çalışmada, He ve ark., TILs'i LAG-3 negatif olan olguların genel sağkalımını 3,04 yıl bulunurken, TILs'i LAG-3 pozitif olan olguların genel sağkalımını 1,08 yıl olarak bulmuştur(109). Bu da TILs'deki LAG-3 ekspresyonu ile ilgili literatürde farklı tümör tiplerinde LAG-3'ün farklı prognostik etkileri olduğunu göstermektedir.

PDF Eraser Free

Burugu ve ark. meme karsinomlarında yaptığı LAG-3 çalışmasında ise östrojen reseptörü (ER) pozitif grupta TILs'deki LAG-3 ekspresyonu sağkalım üzerine anlamlı bir etkisi bulunmazken, ER negatif grupta LAG3+ TILs'in kansere spesifik sağkalımı olumlu yönde artırdığı görülmüştür. Bu da diğer sonuçlar ve bizim sonuçlarımızla birlikte TILs'deki LAG-3 ekspresyonunun farklı tümörlere göre ve aynı tümörün alt tiplerine göre farklı prognostik davranışlar ile ilişkili olduğunu göstermektedir.



SONUÇLAR

1. DBBHL, Hodgkin dışı lenfomalar arasında en sık görülen lenfoma olup her yıl 25 000 yeni vaka bildirilmektedir ve klinik önemi her geçen gün artmaktadır.
2. Tedavide en sık Rituksimab ile kombine edilmiş antrasiklin bazlı kemoterapi rejimi olan R-CHOP kullanılmakla beraber, hastaların bir bölümü tedaviye yanıt vermemekte ya da nüksler nedeniyle kaybedilmekte olduğundan tedaviye yönelik belirteçlerin araştırılması önem taşımaktadır.
3. Hastalık prognozunu öngörmede günümüzde IPI skoru yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak aynı IPI skoruna sahip hastalar arasında sağkalım farklılıkları bulunması nedeniyle yeni prognostik molekülleri araştıran çalışmalar hız kazanmıştır.
4. Tümörlerin gelişiminde mikroçevrenin önemi gün geçtikçe artmakta olup tümör hücrelerinin bağışıklık sistemi hücreleriyle etkileşimlerinin tümör gelişiminde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir ve bu konuyu araştıran çalışmalara ağırlık verilmiştir. Bu çalışmalarda, kontrol noktası reseptörleri giderek önem kazanmakta ve hem tedaviye yönelik hem de prognostik önemleri olduğu düşünülmektedir.
5. Kontrol noktası moleküllerinden, CTLA-4, PD-1 ve PDL-1'in hedeflendiği immünoterapinin dikkat çekici etkisine rağmen yine de birçok hastada tedavi başarısızlığı yaşanmaktadır. Bu nedenle, benzer şekilde bir kontrol noktası molekülü olan ancak kendine özgü farklı özelliklere de sahip olan LAG-3 molekülüne giderek artan bir ilgi mevcuttur.
6. Çeşitli tümör tiplerinde TILs'lerde LAG-3 eksprese edildiğini bulan çalışmalar yapılmış olup, bu ekspresyonun tümörün çeşitli özellikleriyle ilişkisi olduğu ortaya konmuştur. Aynı zamanda bazı çalışmalarda LAG-3+ TILs miktarının sağkalımla negatif, bazılarında pozitif ilişkili olduğu ve bazılarında ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Ancak bu alanda kısıtlı çalışma bulunması nedeniyle bu konuya yönelik araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.
7. Literatürde, LAG-3 molekülünün tümör hücrelerinden ziyade daha çok inflamatuvar hücrelerde eksprese edildiği bilinmekte olup farklı tümör tiplerinde

yapılan çalışmalarda tümör hücrelerinde ekspresyon görülmemiştir. Ancak, çalışmamızda DBBHL hücrelerinde %39 olguda çeşitli şiddetlerde LAG-3 ekspresyonu gözlemledik. Bu bulguyu, literatürde daha önceden benzeri olmaması nedeniyle özgün bulmaktayız. Bu tez çalışması devam ederken yayınlanan üç çalışmada da DBBHL hücrelerinde LAG-3 ekspresyonu gözlenmiş olup çalışmamızdaki bulguları destekler niteliktedir.

8. Tümör hücrelerinde LAG-3 ekspresyonu saptamamızın yanı sıra, önemli bir bulgu olarak, erkek cinsiyette LAG-3+ tümör hücresi oranını anlamlı ölçüde yüksek bulduk($p<0,05$). Literatürde genel sağkalım açısından kadın cinsiyetin DBBHL’de daha iyi olduğunu gösteren çalışmalar bulunmakla birlikte, tümör hücrelerinde LAG-3 ekspresyonunun cinsiyetle ilişkisini gösteren henüz herhangi bir çalışmanın literatürde bulunmaması nedeniyle bu bulguyu önemli ve özgün olarak görmekteyiz.

9. Olgularımızda, LAG-3 eksprese eden TILs sayısı arttıkça tümör hücrelerindeki LAG-3 ekspresyon şiddeti de istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmış bulundu($p<0,05$). LAG-3 pozitif TILs ve tümör hücresindeki LAG-3 şiddetini karşılaştıran bir yayın şu anda literatürde bulunmamakta olup istatistiksel olarak anlamlı bulduğumuz bu sonucu, özgün değeri yüksek olduğu için değerli olarak görmekteyiz. Bu bulgu, TILs’deki LAG-3 ekspresyonuna cevaben tümör hücresindeki ekspresyonun da artmış olabileceğini düşündürüyor olmakla birlikte literatürde başka bir çalışma olmadığından, bu konuda ileri yorum yapabilmek için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

10. Bulgularımız, TILs’teki ve tümör hücrelerindeki LAG-3 ekspresyon artışının genel sağkalımı olumlu yönde etkilediğini düşündürmekle beraber, istatistiksel olarak anlamlı sonuç için daha çok klinik korelasyona ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızın tek merkezli olması ve daha geniş immünohistokimyasal veya farklı(moleküler çalışmalar vs) paneller ile desteklenememesi gibi bir takım kısıtlılıkları bulunmaktadır.

11. Literatürde LAG3+ TILs’in farklı tümör tiplerinde ve aynı tümörün farklı alt tiplerinde farklı prognostik davranışlar gösterdiği bulunmuş olup bu konuyu aydınlatmak için çok sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulduğu açıktır.

KAYNAKLAR

1. Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, Morton LM, Jemal A, Flowers CR. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2016 Nov 12 [cited 2019 Oct 6];66(6):443–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27618563>
2. Epperla N, Hamadani M. Hematopoietic cell transplantation for diffuse large B-cell and follicular lymphoma: Current controversies and advances. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* [Internet]. 2017 Dec [cited 2019 Oct 6];10(4):277–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28633038>
3. 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.
4. Roschewski M, Dunleavy K, Wilson WH. Diffuse large B cell lymphoma: Molecular targeted therapy. *Int J Hematol*. 2012 Nov;96(5):552–61.
5. Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, Vignali DAA. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. Vol. 276, *Immunological Reviews*. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 80–96.
6. Goldberg M V., Drake CG. LAG-3 in Cancer Immunotherapy. In: *Current topics in microbiology and immunology*. Curr Top Microbiol Immunol; 2010. p. 269–78.
7. Lichtenegger FS, Rothe M, Schnorfeil FM, Deiser K, Krupka C, Augsberger C, et al. Targeting LAG-3 and PD-1 to enhance T cell activation by antigen-presenting cells. *Front Immunol*. 2018 Feb 27;9(FEB).
8. Laurent C, Charmpi K, Gravelle P, Tosolini M, Franchet C, Ysebaert L, et al. Several immune escape patterns in non-Hodgkin's lymphomas. *Oncoimmunology*. 2015 Aug 3;4(8).
9. Feller AC, Diebold J, Feller AC, Diebold J. History of Lymphoma Classification. In: *Histopathology of Nodal and Extranodal Non-Hodgkin's Lymphomas*. Springer Berlin Heidelberg; 2004. p. 1–7.
10. Smith JL, Clein GP, Barker CR, Collins RD. CHARACTERISATION OF MALIGNANT MEDIASTINAL LYMPHOID NEOPLASM (STERNBERG SARCOMA) AS THYMIC IN ORIGIN. *Lancet*. 1973 Jan 13;301(7794):74–7.
11. Jaffe ES, Shevach EM, Frank MM, Berard CW, Green I. Nodular Lymphoma — Evidence for

- 62

Positive Diffuse Large B

-Cell Lymphoma of the Elderly

Oncologist. 2011 Jan;16(1):87–96.

23. A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of non-Hodgkin's Lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project - PubMed [Internet]. [cited 2020 Apr 29]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9166827/>
24. 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;9(7):717–20.
25. Yao Z, Deng L, Xu-Monette ZY, Manyam GC, Jain P, Tzankov A, et al. Concordant bone marrow involvement of diffuse large B-cell lymphoma represents a distinct clinical and biological entity in the era of immunotherapy. *Leukemia*. 2018 Feb 1;32(2):353–63.
26. Korkolopoulou P, Vassilakopoulos T, Milionis V, Ioannou M. Recent Advances in Aggressive Large B-cell Lymphomas: A Comprehensive Review. Vol. 23, *Advances in Anatomic Pathology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2016. p. 202–43.
27. Li S, Young KH, Medeiros LJ. Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology*. 2018;50(1):74–87.
28. 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 20;39(1):61–6.
29. Brudno J, Tadmor T, Pittaluga S, Nicolae A, Polliack A, Dunleavy K. Discordant bone marrow involvement in non-Hodgkin lymphoma. Vol. 127, *Blood*. American Society of Hematology; 2016. p. 965–70.
30. Loddenkemper C, Anagnostopoulos I, Hummel M, Jöhrens-Leder K, Foss HD, Jundt F, et al. Differential Eμ enhancer activity and expression of BOB.1/OBF.1, Oct2, PU.1, and immunoglobulin in reactive B-cell populations, B-cell non-Hodgkin lymphomas, and Hodgkin lymphomas. *J Pathol*. 2004 Jan;202(1):60–9.
31. Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Klasa R, et al. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol* [Internet]. 2005 Aug 1 [cited 2020 Apr 7];23(22):5027–33. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2005.09.137>
32. 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.

33. Georgiou K, Chen L, Berglund M, Ren W, De Miranda NFCC, Lisboa S, et al. Genetic basis of PD-L1 overexpression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2016 Jun 16;127(24):3026–34.
34. 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.
35. Tagawa H, Suguro M, Tsuzuki S, Matsuo K, Karnan S, Ohshima K, et al. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1770–7.
36. Karube K, Enjuanes A, Dlouhy I, Jares P, Martin-Garcia D, Nadeu F, et al. Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets. *Leukemia*. 2018 Mar 1;32(3):675–84.
37. 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*. 1994 Jul 14;331(2):74–80.
38. Kramer MHH, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, Van Krieken JHJM, et al. Clinical Relevance of BCL2, BCL6, and MYC Rearrangements in Diffuse Large B-Cell Lymphoma [Internet]. Vol. 92, *Blood*. 1998 [cited 2020 Apr 7]. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/92/9/3152/1648331/3152.pdf>
39. Alizadeh AA, Elsen MB, Davis RE, Ma CL, 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.
40. 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.
41. Dybkær K, Bøgsted M, Falgreen S, Bødker JS, Kjeldsen MK, Schmitz A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma classification system that associates normal B-cell subset phenotypes with prognosis. *J Clin Oncol*. 2015 Apr 20;33(12):1379–88.
42. Morin RD, Mungall K, Pleasance E, Mungall AJ, Goya R, Huff RD, et al. Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole-genome sequencing. *Blood*. 2013 Aug 15;122(7):1256–65.
43. Zhang J, Grubor V, Love CL, Banerjee A, Richards KL, Mieczkowski PA, et al. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jan

22;110(4):1398–403.

44. A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*. 1993 Sep 30;329(14):987–94.
45. Liu Y, Barta SK. Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, stratification, and treatment. *Am J Hematol* [Internet]. 2019 May 4 [cited 2020 Apr 9];94(5):604–16. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ajh.25460>
46. Wiestner A. Targeting B-cell receptor signaling for anticancer therapy: The Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib induces impressive responses in B-cell malignancies. Vol. 31, *Journal of Clinical Oncology*. J Clin Oncol; 2013. p. 128–30.
47. Bohers E, Mareschal S, Bertrand P, Viailly PJ, Dubois S, Maingonnat C, et al. Activating somatic mutations in diffuse large B-cell lymphomas: Lessons from next generation sequencing and key elements in the precision medicine era. Vol. 56, *Leukemia and Lymphoma*. Informa Healthcare; 2015. p. 1213–22.
48. Karmali R, Gordon LI. Molecular Subtyping in Diffuse Large B Cell Lymphoma: Closer to an Approach of Precision Therapy. Vol. 18, *Current Treatment Options in Oncology*. Springer New York LLC; 2017.
49. Hartkopf AD, Taran FA, Wallwiener M, Walter CB, Krämer B, Grischke EM, et al. PD-1 and PD-L1 Immune Checkpoint Blockade to Treat Breast Cancer. *Breast Care*. 2016;11(6):385–90.
50. 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. *Eur Hematol Assoc Haematol* [Internet]. 2016 [cited 2020 May 19];101(5):531–40. Available from: www.haematologica.org/content/101/5/531
51. 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.
52. Shi-Wen X, Leask A, Abraham D. Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis. Vol. 19, *Cytokine and Growth Factor Reviews*. Cytokine Growth Factor Rev; 2008. p. 133–44.
53. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Vol. 86, *Cell*. Cell Press; 1996. p. 353–64.
54. 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.
55. Arruga F, Vaisitti T, Deaglio S. The NOTCH pathway and its mutations in mature B cell malignancies. Vol. 8, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
 56. Clozel T, Yang SN, Elstrom RL, Tam W, Martin P, Kormaksson M, et al. Mechanism-based epigenetic chemosensitization therapy of diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Discov*. 2013 Sep;3(9):1002–19.
 57. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008 Apr;26(1):677–704.
 58. Long L, Zhang X, Chen F, Pan Q, Phiphatwatchara P, Zeng Y, et al. The promising immune checkpoint LAG-3: From tumor microenvironment to cancer immunotherapy. *Genes and Cancer*. 2018 May 1;9(5–6):176–89.
 59. Huard B, Gaulard P, Faure F, Hercend T, Triebel F. Cellular expression and tissue distribution of the human LAG-3-encoded protein, an MHC class II ligand. *Immunogenetics*. 1994;39(3):213–7.
 60. Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, Roman-Roman S, Genevee C, Viegas-Pequignot E, et al. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med*. 1990 May 1;171(5):1393–405.
 61. Dijkstra JM, Somamoto T, Moore L, Hordvik I, Ototake M, Fischer U. Identification and characterization of a second CD4-like gene in teleost fish. *Mol Immunol*. 2006 Feb 1;43(5):410–9.
 62. Baixeras E, Huard B, Miossec C, Jitsukawa S, Martin M, Hercend T, et al. Characterization of the Lymphocyte Activation Gene 3-Encoded Protein. A New Ligand for Human Leukocyte Antigen Class II Antigens. *J Exp Med*. 1992 Aug 1;176(2):327–37.
 63. Workman CJ, Vignali DAA. The CD4-related molecule, LAG-3 (CD223), regulates the expansion of activated T cells. Vol. 33, *European Journal of Immunology*. *Eur J Immunol*; 2003. p. 970–9.
 64. Kisielow M, Kisielow J, Capoferri-Sollami G, Karjalainen K. Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells. *Eur J Immunol*. 2005 Jul;35(7):2081–8.
 65. CJ W, DS R, KJ D, C K, DA V. Phenotypic Analysis of the Murine CD4-related Glycoprotein, CD223 (LAG-3). *Eur J Immunol*. 2002;32(8).
 66. Hannier S, Triebel F. The MHC class II ligand lymphocyte activation gene-3 is co-distributed

with CD8 and CD3-TCR molecules after their engagement by mAb or peptide-MHC class I complexes. *Int Immunol.* 1999;11(11):1745–52.

67. Workman CJ, Dugger KJ, Vignali DAA. Cutting Edge: Molecular Analysis of the Negative Regulatory Function of Lymphocyte Activation Gene-3. *J Immunol.* 2002 Nov 15;169(10):5392–5.
68. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 2004 Oct;21(4):503–13.
69. Gandhi MK, Lambley E, Duraiswamy J, Dua U, Smith C, Elliott S, et al. Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8 T-cell function in Hodgkin lymphoma patients. 2006 [cited 2020 Apr 26]; Available from: www.bloodjournal.org
70. Camisaschi C, Casati C, Rini F, Perego M, De Filippo A, Triebel F, et al. LAG-3 Expression Defines a Subset of CD4 + CD25 high Foxp3 + Regulatory T Cells That Are Expanded at Tumor Sites . *J Immunol.* 2010 Jun 1;184(11):6545–51.
71. Grosso JF, Kelleher CC, Harris TJ, Maris CH, Hipkiss EL, De Marzo A, et al. LAG-3 regulates CD8+ T cell accumulation and effector function in murine self- and tumor-tolerance systems. *J Clin Invest.* 2007 Nov 1;117(11):3383–92.
72. Turnis ME, Andrews LP, Vignali DAA. Inhibitory receptors as targets for cancer immunotherapy. Vol. 45, *European Journal of Immunology.* Wiley-VCH Verlag; 2015. p. 1892–905.
73. Durham NM, Nirschl CJ, Jackson CM, Elias J, Kochel CM, Anders RA, et al. Lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) modulates the ability of CD4 T-cells to be suppressed In Vivo. *PLoS One.* 2014 Nov 5;9(11).
74. Hemon P, Jean-Louis F, Ramgolam K, Brignone C, Viguier M, Bachelez H, et al. MHC Class II Engagement by Its Ligand LAG-3 (CD223) Contributes to Melanoma Resistance to Apoptosis. *J Immunol.* 2011 May 1;186(9):5173–83.
75. Li FJ, Zhang Y, Jin GX, Yao L, Wu DQ. Expression of LAG-3 is coincident with the impaired effector function of HBV-specific CD8+ T cell in HCC patients. *Immunol Lett.* 2013 Feb;150(1–2):116–22.
76. Takaya S, Saito H, Ikeguchi M. Upregulation of immune checkpoint molecules, PD-1 and LAG-3, on CD4+ and CD8+ T cells after gastric cancer surgery. *Yonago Acta Med.* 2015;58(1):39–44.

77. Yang ZZ, Kim HJ, Villasboas JC, Chen YP, Price-Troska TP, Jalali S, et al. Expression of LAG-3 defines exhaustion of intratumoral PD-1+ T cells and correlates with poor outcome in follicular lymphoma. *Oncotarget*. 2017 Sep 1;8(37):61425–39.
78. He Y, Yu H, Rozeboom L, Rivard CJ, Ellison K, Dziadziuszko R, et al. LAG-3 Protein Expression in Non–Small Cell Lung Cancer and Its Relationship with PD-1/PD-L1 and Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2017 May [cited 2019 Oct 2];12(5):814–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28132868>
79. Fiorilli M, Tedesco T, Mazzone AM, Paganelli R, Scala E, Carbonari M, et al. Subpopulations Coregulated in Different Human T Lymphocyte Production Are Variably γ Expression and IFN-Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3) [Internet]. 1998 [cited 2020 Apr 29]. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/161/1/489>
80. Bos R, Marquardt KL, Cheung J, Sherman LA. Functional differences between low- and highaffinity CD8+ T cells in the tumor environment. *Oncoimmunology*. 2012;1(8):1239–47.
81. Farsam V, Hassan ZM, Zavarán-Hosseini A, Noori S, Mahdavi M, Ranjbar M. Antitumor and immunomodulatory properties of artemether and its ability to reduce CD4 + CD25 + FoxP3 + T reg cells in vivo. *Int Immunopharmacol*. 2011 Nov;11(11):1802–8.
82. Wei T, Zhang J, Qin Y, Wu Y, Zhu L, Lu L, et al. Increased expression of immunosuppressive molecules on intratumoral and circulating regulatory T cells in non-small-cell lung cancer patients. *Am J Cancer Res*. 2015;5(7):2190–201.
83. Huard B, Tournier M, Triebel F. LAG-3 does not define a specific mode of natural killing in human. *Immunol Lett*. 1998 Apr;61(2–3):109–12.
84. Miyazaki T, Dierich A, Benoist C, Mathis D. Independent modes of natural killing distinguished in mice lacking Lag3. *Science* (80-). 1996 Apr 19;272(5260):405–8.
85. Sun H, Sun C, Xiao W. Expression regulation of co-inhibitory molecules on human natural killer cells in response to cytokine stimulations. *Cytokine*. 2014 Jan;65(1):33–41.
86. Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, et al. Regulatory T Cells Inhibit Dendritic Cells by Lymphocyte Activation Gene-3 Engagement of MHC Class II. *J Immunol*. 2008 May 1;180(9):5916–26.
87. Workman CJ, Wang Y, El Kasmi KC, Pardoll DM, Murray PJ, Drake CG, et al. LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis. *J Immunol*. 2009 Feb 15;182(4):1885–91.
88. Camisaschi C, De Filippo A, Beretta V, Vergani B, Villa A, Vergani E, et al. Alternative

- activation of human plasmacytoid DCs in vitro and in melanoma lesions: Involvement of LAG-3. *J Invest Dermatol.* 2014;134(7):1893–902.
89. Chen BJ, Dashnamoorthy R, Galera P, Makarenko V, Chang H, Ghosh S, et al. The immune checkpoint molecules PD-1, PD-L1, TIM-3 and LAG-3 in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget.* 2019;10(21):2030–40.
90. Altman DG, McShane LM, Sauerbrei W, Taube SE. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK): Explanation and elaboration. *PLoS Med.* 2012 May;9(5).
91. Home - TR | Turnitin [Internet]. [cited 2020 Jun 4]. Available from: <https://www.turnitin.com/tr>
92. Alkan S, Doğan M. Pratik Neoplastik Lenf Nodu Patolojisi. Ankara; 2016.
93. Epperla N, Hamadani M. Hematopoietic cell transplantation for diffuse large B-cell and follicular lymphoma: Current controversies and advances. Vol. 10, Hematology/ Oncology and Stem Cell Therapy. King Faisal Specialist Hospital and Research Centre; 2017. p. 277–84.
94. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: Mechanisms of action, efficacy, and limitations. Vol. 8, Frontiers in Oncology. Frontiers Media S.A.; 2018.
95. Cashen A, Van Tine B. The Washington manual hematology and oncology subspecialty consult. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2012. 474 p.
96. 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* [Internet]. 2008 Jan [cited 2020 Jun 4];49(8):1501–9. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10428190802140055>
97. Costa LJ, Maddocks K, Epperla N, Reddy NM, Karmali R, Umyarova E, et al. Diffuse large B-cell lymphoma with primary treatment failure: Ultra-high risk features and benchmarking for experimental therapies. *Am J Hematol.* 2017 Feb 1;92(2):161–70.
98. Coiffier B, Sarkozy C. Diffuse large B-cell lymphoma: R-CHOP failure-what to do? *Hematology.* 2016;2016(1):366–78.
99. Burugu S, Gao D, Leung S, Chia SK, Nielsen TO. LAG-3+ tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer: Clinical correlates and association with PD-1/PD-L1+ tumors. *Ann Oncol.* 2017;28(12):2977–84.

100. Keane C, Law SC, Gould C, Birch S, Sabdia MB, Merida De Long L, et al. LAG3: a novel immune checkpoint expressed by multiple lymphocyte subsets in diffuse large B-cell lymphoma. 2020 [cited 2020 Jun 5]; Available from: <https://ashpublications.org/bloodadvances/article-pdf/4/7/1367/1723421/advancesadv2019001390.pdf>
101. 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.
102. Scott DW, Mottok A, Ennishi D, Wright GW, Farinha P, Ben-Neriah S, et al. Prognostic significance of diffuse large B-cell lymphoma cell of origin determined by digital gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue biopsies. *J Clin Oncol*. 2015;33(26):2848–56.
103. 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;6(8):5615–33.
104. Campuzano-Zuluaga G, Cioffi-Lavina M, Lossos IS, Chapman-Fredricks JR. Frequency and extent of CD30 expression in diffuse large B-cell lymphoma and its relation to clinical and biologic factors: A retrospective study of 167 cases. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2013 Nov 4 [cited 2020 Jun 5];54(11):2405–11. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10428194.2013.778407>
105. Feng Y, Zhong M, Liu Y, Wang L, Tang Y. Expression of TIM-3 and LAG-3 in extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type. *Histol Histopathol*. 2018 Mar 1;33(3):307–15.
106. Huang HH, Hsiao FY, Chen LJ, Chen HM, Ko BS. Women with diffuse large B cell lymphoma benefit more from rituximab-containing chemotherapy. *J Women's Heal*. 2019 Feb 1;28(2):203–11.
107. Que Y, Fang Z, Guan Y, Xiao W, Xu B, Zhao J, et al. LAG-3 expression on tumor-infiltrating T cells in soft tissue sarcoma correlates with poor survival. *Cancer Biol Med*. 2019 Apr 1;16(2):331–40.
108. Datar I, Sanmamed MF, Wang J, Henick BS, Choi J, Badri T, et al. Expression analysis and significance of PD-1, LAG-3, and TIM-3 in human non-small cell lung cancer using spatially resolved and multiparametric single-cell analysis. *Clin Cancer Res*. 2019 Aug 1;25(15):4663–73.
109. He Y, Yu H, Rozeboom L, Rivard CJ, Ellison K, Dziadziuszko R, et al. LAG-3 Protein

PDF Eraser Free

Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Its Relationship with PD-1/PD-L1 and Tumor-Infiltrating Lymphocytes. J Thorac Oncol. 2017 May 1;12(5):814–23.





EK-1 (ÖZGEÇMİŞ)

I- Bireysel Bilgiler

- Adı-Soyadı: Emine Begüm COŞKUN
- Doğum yeri ve tarihi:
- Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti.
- Medeni durumu: Evli.
- Askerlik durumu: Muaf.
- İletişim adresi ve telefonu:
- Yabancı dili: İngilizce.

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

- Tıbbi Patoloji Uzmanlık Eğitimi: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Dr Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Patoloji Bölümü, Araştırma Görevlisi (2016-2020).
- Tıp Fakültesi Eğitimi: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi (2008-2014).
- Orta Öğretim: Ordu Fen Lisesi (2004-2007).
- İlköğretim: Prof Dr İhsan Koz İlköğretim Okulu (1996-2004),

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru)

- Tıp Doktoru (2014).

IV- Mesleki Deneyimi

- Tıbbi Patoloji Uzmanlık Eğitimi: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Dr Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Patoloji Bölümü-Asistan Doktor Temmuz 2016- Devam ediyor).
- T.C Sağlık Bakanlığı Sakarya Yenikent Devlet Hastanesi Diyaliz Ünitesi-Tabip (29.09.2014-01.06.2015)

- T.C Sağlık Bakanlığı Sakarya Geyve Devlet Hastanesi Acil Servis-Tabip (29.09.2014-01.06.2015)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

- Ankara Patoloji Derneği.
- Avrupa Patoloji Derneği.

VI- Bilimsel Çalışmalar

Yayın: -

Bildiri: -

VII- Diğer Bilgiler

Sertifikalar ve Yeterlilik Belgeleri: -

EK-2 (TEZ KONUSU ONAY FORMU)

Uzmanlık Öğrencisinin Adı Soyadı: Telefon: E-Posta:	
Uzmanlık Dalı:	Tıbbi Patoloji
Eğitim Kurumu:	Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Dr. Abdurrahman YURTASLAN Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Uzmanlık Eğitimine Başlama Tarihi:	01.07.2016
Uzmanlık Eğitimini Bitirme Tarihi:	01.07.2020
Program Yöneticisinin Adı Soyadı:	Prof. Dr. Olçay KANDEMİR
Tez Danışmanının Adı Soyadı: Telefon: E-Posta:	Prof. Dr. Olçay Kandemir

1-Tez Başlığı/Konusu: Diffüz Büyük B hücreli Lenfomalarda, “Lymphocyte Activation Gene-3(LAG-3) (CD223)” ekspresyonunun histopatolojik ve prognostik belirteçler ile ilişkisinin değerlendirilmesi.

2-Araştırma sorusu: Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomalarda LAG-3 ekspresyon sıklığı nedir? Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomalarda LAG-3 ekspresyonu var ise Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomanın alt tiplerinde ekspresyon farklılığı var mıdır? Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma hastalarında LAG-3 ekspresyonunun klinik tablo ve prognoz ile ilişkisi var mıdır?

3-Araştırmanın amacı: Lag-3 ekspresyonunun, Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomanın hücre orijinine göre alt tiplerinde (Germinal Merkez/ Germinal Merkez Dışı fenotipi), hastalığın evresi, hastanın Uluslararası Prognostik İndeksi (IPI), hastalıkta kullanılan ilaçlar ve R-CHOP tedavisine yanıt ilişkisine göre farklılık gösterip göstermediğini araştırmayı amaçlamaktayız.

4-Araştırma materyalleri, popülasyonu: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Dr. Abdurrahman YURTASLAN Onkoloji Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde 2007-2019 yılları arasında tanı almış "Diffüz büyük B hücreli lenfoma" vakaları retrospektif olarak taranacak ve çalışmaya dahil edilen vakalarda tümör hücrelerinde ve tümörü infiltrate eden lenfositlerde immünohistokimyasal olarak LAG-3 ekspresyonu incelenecektir.

5-Dahil etme ve hariç tutma kriterleri: Dahil etme kriterleri; patoloji otomasyon sisteminde kayıtlarına ulaşılabilen, parafin bloklarına ulaşılabilen ve histopatolojik olarak doku biyopsisinde tanı teyidi yapılabilen vakalar.

Hariç tutma kriterleri; parafin bloklarına ve kayıtlarına ulaşamayan, patoloğlar arası tanısal uyumsuzluk olan ve bloklarında inceleme için yeterli doku bulunmayan olgular.

6-Araştırmanın birincil sonuç değişkenleri: Doku biyopsisinde Diffüz Büyük B hücreli Lenfoma tanısı almış olgularda tümör hücrelerinde ve tümörü infiltrate eden lenfositlerde LAG-3 ekspresyon varlığı,

7-Araştırmanın türü ve tasarımı: Çalışmamız retrospektif bir çalışma olarak dizayn edilmiştir.

8-Araştırma hipotezi: Çalışmamızda araştıracağımız LAG-3 immünohistokimyasal belirtecinin, Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma olgularında, kötü prognoz ile korele olabileceğini düşünmekteyiz. Bunun yanı sıra, kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterildiği takdirde, prognozu öngörebilecek yardımcı bir yöntem olarak kullanabileceğini ve halen faz-3 çalışmaları devam etmekte olan Anti-Lag-3 monoklonal antikoru (Lag525) ile bu olguların tedavi edilebileceğini öngörmekteyiz.

9-Örneklem sayısı ve belirleme yöntemi: Ankara Dr Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Patoloji

Laboratuvarı'nda arşiv patoloji raporları taranarak tespit edilen 2007-2019 yılları arasında tanı almış 217 adet Diffüz büyük B hücreli lenfoma olgusunun çalışmaya dahil edilmesi hedeflenmiştir.

10-Araştırmada kullanılacak istatistik yöntemler: Verilerin analizi IBM SPSS Statistics 17.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) paket programında yapıldı. Kesikli sayısal değişkenlerin dağılımının normale yakın dağılıp dağılmadığı Kolmogorov-Smirnov testiyle incelendi. Tanımlayıcı istatistikler; kesikli sayısal değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma veya medyan (minimum - maksimum) biçiminde ifade edilirken kategorik (nominal ve ordinal) değişkenler olgu sayısı ve (%) şeklinde gösterildi.

Yapılan uyum iyiliği testleri sonucunda parametrik test istatistiği varsayımlarının sağlanmadığı kesikli sayısal değişkenler ile ordinal değişkenler yönünden gruplar arasındaki farkların önemliliği Mann Whitney U testi ile incelendi. 2x2'lik çapraz tablolarda gözelerin en az $\frac{1}{4}$ 'ünde beklenen frekansın 5'in altında olması durumunda söz konusu kategorik veriler Fisher'in kesin sonuçlu olasılık testiyle değerlendirilirken beklenen frekansın 5-25 arasında olduğu durumlarda Süreklilik Düzeltmeli Ki-Kare testi kullanılıp aksi durumlarda Pearson'un Ki-Kare testiyle inceleme yapıldı. Lag-3 TIL, Lag-3 neoplastik hücre yüzdesi ve Lag-3 neoplastik hücre şiddet düzeyleri ile yaş, evre, IPI-7 ve Ki-67 boyanma yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon olup olmadığı ise Spearman'ın sıra sayıları korelasyon testi ile araştırıldı.

Lag-3 TIL, Lag-3 neoplastik hücre yüzdesi ve Lag-3 neoplastik hücre şiddetinin ölüm hızı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olup olmadığı tek değişkenli Cox'un oransal hazard regresyon analizi ile incelendi. Her bir değişkene ait rölatif risk (RR) ve %95 güven aralıkları hesaplandı. Lag-3 TIL, Lag-3 neoplastik hücre yüzdesi ve Lag-3 neoplastik hücre şiddetine göre oluşturulan gruplar arasında genel sağkalım yönünden farkların önemliliği ise Log-Rank testi kullanılarak Kaplan-Meier sağkalım analizi ile değerlendirildi. Her bir alt grup içerisinde kaba sağkalım oranları, 1-3 ve 5 yıllık sağkalım hızları ile beklenen ortalama yaşam süresi ve bu süreye ilişkin %95 güven aralıkları hesaplandı. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

11-Araştırmanın orijinalliğı ve bilime katkısının açıklaması: Tümörlerin mikroçevre ile ilişkisi ve kontrol noktası blokajı ile ilişkili son dönemde çok fazla çalışma yapılmakla birlikte bu alanda daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Diffüz Büyük B hücreli Lenfomalarda, LAG-3 molekülü ile ilgili bilgiler kısıtlıdır. Bu nedenle yapacağımız çalışmayı, hem literatürde az sayıda örneğinin bulunması hem de diffüz büyük B hücreli lenfoma hastalarında prognoz tahmin edilmesine yardımcı olma ve hedefe yönelik tedavi için kullanılabilme ihtimali sebebiyle özgün ve değerli olarak görmekteyiz

12-Açıklamak istediğiniz diğer konular: Yoktur.

Kontrol edilmiştir ve uygundur.

Prof. Dr. Olçay KANDEMİR

(Tez danışmanı)

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomalarda, "Lymphocyte Activation-3(LAG-3) (CD223)" Ekspresyonunun Histopatolojik ve Prognostik Belirteçler ile İlişkisinin Değerlendirilmesi					
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU							

DEĞERLENDİRİLE N BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒	İngilizce ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama
		SİGORTA
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐
	İLAN	☐
	YILLIK BİLDİRİM	☐
	SONUÇ RAPORU	☐
	GUVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐
	DİĞER:	☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2019-02/201	Tarih: 06.02.2019
-----------------	-----------------------	-------------------

Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplanmış katılan etik kurul üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.

İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Doç. Dr. Lütfi DOĞAN				

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Doç. Dr. Lütfi DOĞAN	Genel Cerrahi	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Olcay KANDEMİR	Patoloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Necati ALKİŞ	Tıbbi Onkoloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Mustafa ARSLAN	Fizyoloji/Anestezi	Gazi Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Nur AKSAKAL	İlaç Sağlığı	Gazi Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	
Doç. Dr. Tolga Reşat AYDOS	Farmakoloji	Başkent Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Aşkın Esen HASTÜRK	Beyin Cerrahi	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Neriman SARI	Hematoloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Eşref Oğuz GÜVEN	Oroloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Merih KIZIL ÇAKAR	Hematoloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐ K ☒	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	
Doç. Dr. Nazan ÇİLEDAĞ GÖKBAYRAK	Radyoloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Op. Dr. Hakan BULAK	Genel Cerrahi	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒ K ☐	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	
Uz. Dr. Özlem ŞEN	Anestezi	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Av. Arzu BATUR	Avukat	Ankara İl Sağlık Md.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	
Sos. Hiz. Seyit ULUPINAR	Sosyal Hizmet Uzm.	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒ K ☐	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Lütfi DOĞAN
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

Scanned by CamScanner

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Diğer Büyük B Hücreli Lenfomalarda, "Lymphocyte Activation-3(LAG-3) (CD223)" Ekspresyonunun Histopatolojik ve Prognostik Belirteçler ile İlişkisinin Değerlendirilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	T.C SAĞLIK BAKANLIĞI İL SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ DR.ABDURRAHMAN YURTASLAN ANKARA ONKOLOJİ SAĞLIK UYGULAMA ve ARAŞTIRMA MERKEZİ ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	T.C Sağlık Bakanlığı İl Sağlık Müdürlüğü Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Abdurrahman YURTASLAN Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mehmet Akif Ersoy Mahallesi 13. Cadde No:56 Yenimahalle-06200/ANKARA
	TELEFON	0 312 336 96 81
	FAKS	0 312 336 96 81
	E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Olcay KANDEMİR			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Patoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji SUAM			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☒		
Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐	

EK-4 (TURNİTİN ORJİNALLİK RAPORU)

Turnitin Orjinallik Raporu

İşleme kondu: 10-Haz-2020 7:18 ÖS +03

NUMARA: 1341382699

Kelime Sayısı: 13473

Gönderildi: 1

DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMA OLGULARINDA LENFOSİT
AKTİVASYON GENİ-3 (LAG-3) EKSPRESYONUNUN HİSTOPATOLOJİK VE
PROGNOSTİK BELİRTEÇLER İLE İLİŞKİSİ Emine Begüm Coskun

Benzerlik Endeksi	Kaynağa göre Benzerlik
%5	Internet Sources: %4
	Yayınlar: %2
	Öğrenci Ödevleri: %4

