

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMADA (DAHA
İLERİ SPESİFİYE EDİLEMİYEN, NOS) CD30, BCL-2 VE
C-MYC PROTEİN EKSPRESYONLARI İLE BCL-2 VE
C-MYC TRANSLOKASYONLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Hülya KAÇAR

Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2020

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMADA (DAHA
İLERİ SPESİFİYE EDİLEMİYEN, NOS) CD30, BCL-2 VE
C-MYC PROTEİN EKSPRESYONLARI İLE BCL-2 VE
C-MYC TRANSLOKASYONLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Hülya KAÇAR

Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI
Prof. Dr. Serap İŐIKSOY

ESKİŞEHİR

2020

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

Dr. Hülya KAÇAR'a ait "Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomada (Daha İleri Spesifiye Edilemeyen, NOS) CD30, BCL-2, C-MYC Protein Ekspresyonları ile BCL-2 ve C-MYC Translokasyonlarının Değerlendirilmesi" adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih

Jüri Başkanı Prof. Dr. Serap IŞIKSOY
Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr. Emine DÜNDAR
Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr. Işımsu KUZU
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun/...../.....
Tarih ve/..... Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Özkan ALATAŞ
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda almış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile desteklerini her zaman yanımda hissettiğim değerli hocalarım Prof. Dr. Özgül PAŞAOĞLU'na, Prof. Dr. Sare KABUKÇUOĞLU'na, Prof. Dr. Emine DÜNDAR'a, Prof. Dr. Mustafa Fuat AÇIKALIN'a, Doç. Dr. Deniz ARIK'a, Dr. Öğr. Üyesi Evrim YILMAZ'a, Dr. Öğr. Üyesi Funda CANAZ'a, eğitimimde ve tezimin hazırlanmasında katkılarını eksik etmeyen ve aynı zamanda danışman hocam olan Sayın Prof. Dr. Serap IŞIKSOY'a, FISH çalışmasını gerçekleştiren Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Beyhan DURAK ARAS ve araştırma görevlisi Sevgi ÖZPOLAT'a, klinik değerlendirmeyi yapan İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Eren GÜNDÜZ'e, istatistiksel değerlendirmeyi yapan Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ertuğrul Çolak'a ve araştırma görevlisi Hülya ÖZEN'e destekleri için teşekkür ederim.

ÖZET

Kaçar H. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomada (Daha İleri Spesifiye Edilemeyen, NOS) CD30, BCL-2 ve C-MYC Protein Ekspresyonları ile BCL-2 ve C-MYC Translokasyonlarının Değerlendirilmesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı tıpta uzmanlık tezi, Eskişehir, 2020.

Diffüz büyük B hücreli lenfoma yetişkinlerde görülen Non-Hodgkin lenfomaların yaklaşık %35'ini oluşturmaktadır. Diffüz büyük B hücreli lenfoma kategorisi heterojen olup, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2016 lenfoma sınıflamasında, farklı klinikopatolojik ve moleküler özellikler temelinde yeni antiteler oluşturulmuş, yüksek dereceli ve özel tip lenfoma olarak sınıflandırılmayan büyük B hücreli lenfomalar (DLBCL), daha ileriye spesifiye edilemeyen (NOS) DLBCL olarak tanımlanmıştır. Bu kategorideki olgular moleküler özelliklerine göre GEP analizi ve immünohistokimyasal (Hans) algoritmalarıyla GCB ve ABC alt tiplere gruplandırılmıştır. Çalışmamızda BCL2, BCL6, MYC gen anormalliklerinin FISH ile değerlendirilmesi sonucu "DLBCL, NOS" kategorisine alınan 45 olgu Hans algoritmasına göre GCB (15 olgu) ve Non-GCB (45 olgu) olmak üzere moleküler alt tiplere ayrılmıştır. Bu olgularda CD30, BCL2, BCL6, MYC protein ekspresyonları, double ekspresyon durumu değerlendirilmiş ve FISH ile saptanan gen anormallikleri ile aralarındaki ilişki araştırılmıştır. FISH ile saptanan BCL2, BCL6, MYC gen anormallikleri ile protein ekspresyonları arasında korelasyon saptanmamıştır ($p>0,05$). Nodal orjinli lenfomalarda BCL2 ekspresyon sıklığı ve Non-GCB tipte BCL2 ve double ekspresyon sıklığı yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). CD30 ekspresyonu olan olgularda Ki-67 proliferasyon indeksi yüksektir ($p<0,05$). CD30 ekspresyonu olan olgularda MYC gen anormallikleri saptanmamıştır ($p>0,05$). MYC translokasyon ve kopya sayısı artışı olan olgularda Ann-Arbor evre ve LDH düzeyi yüksek saptanmıştır ($p<0,05$). BCL2, BCL6 ve MYC kopya sayısı artışlarında sıklıkla birliktelik görülmüştür ($p<0,05$). Günlük pratikte olgularda bu faktörlerin bilinmesinin prognozun öngörülebilirliği ve tedavi planlaması açısından faydalı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: diffüz büyük B hücreli lenfoma, NOS, CD30 ekspresyonu

ABSTRACT

Kaçar H. Evaluation of CD30, BCL-2 and C-MYC Protein Expression, BCL-2 and C-MYC Translocation in Diffuse Large B Cell Lymphoma (Not Otherwise Specified, NOS). Eskisehir Osmangazi University, Faculty of Medicine, Department of Medical Pathology, Speciality Thesis in Medicine, Eskisehir, 2020. Diffuse large B cell lymphoma accounts for approximately 35% of Non-Hodgkin lymphomas seen in adults. Diffuse large B-cell lymphoma category is heterogeneous and in the World Health Organization (WHO) 2016 lymphoma classification, new entities have been created on the basis of different clinicopathological and molecular features. Large B-cell lymphomas, which cannot be classified as high-grade and special-type lymphoma is defined as DLBCL, NOS. The cases in this category were grouped into GCB and ABC subtypes with GEP analysis and immunohistochemical (Hans) algorithms according to their molecular features. In our study, 45 cases that were included in the "DLBCL, NOS" category as a result of the evaluation of BCL2, BCL6, MYC gene abnormalities with FISH were divided into molecular subtypes as GCB (15 cases) and Non-GCB (45 cases) according to Hans algorithm. In these cases, CD30, BCL2, BCL6, MYC protein expressions, double expression status were evaluated and their relationship with gene abnormalities detected by FISH was investigated. There was no correlation between BCL2, BCL6, MYC gene abnormalities detected by FISH and protein expressions ($p > 0.05$). BCL2 expression frequency in lymphomas of nodal origin and BCL2 and double expression frequency in Non-GCB type were found to be high ($p < 0.05$). In cases with CD30 expression, the proliferation index of KI-67 is high ($p < 0.05$). There were no MYC gene abnormalities in cases with CD30 expression ($p > 0.05$). Ann-Arbor stage and LDH level were found to be high in cases with MYC translocation and copy number increase ($p < 0.05$). There was frequent association in BCL2, BCL6 and MYC copy number increases ($p < 0.05$). It is thought that knowing these factors in cases in daily practice will be useful in terms of predictability of prognosis and treatment planning.

Key Words: diffuse large B-cell lymphoma, NOS, CD30 expression

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Lenfoid Sistem ve Organları	2
2.2. Lenf Nodunun Embriyolojisi	2
2.3. Lenf Nodunun Anatomisi	4
2.4. Lenf Nodunun Histolojisi	4
2.5. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma, Daha İleriye Spesifiye Edilemeyen (NOS)...	8
2.6. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Epidemiyolojisi	10
2.7. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Etyolojisi	11
2.8. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Klinik Özellikleri	11
2.9. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Morfolojik Özellikleri.....	12
2.10. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma İmmünofenotipik Özellikleri.....	13
2.11. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomada Hücre Orjini ve Moleküler Alt Gruplandırma	17
2.12. Genetik Özellikler	19
2.13. Prognostik Özellikler.....	23
2.14. 2016 DSÖ Büyük B Hücreli Lenfomalar Sınıflamasında Yer Alan Özel Lenfoma Tipleri	27
2.15. Yüksek Dereceli B Hücreli Lenfoma (HGBL).....	28
2.16. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma, NOS Tedavisi	30
2.17. Ayırıcı Tanı	31

3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Olguların Seçimi	32
3.2. Histopatolojik İnceleme	32
3.3. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	33
3.4. İmmünohistokimyasal Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi	33
3.5. FISH Yöntemi	34
3.6. FISH Değerlendirmesi	36
3.7. Klinik Veriler, Evre ve IPI skorlaması.....	37
3.8. İstatiksel Analiz	37
4. BULGULAR	41
4.1. Klinik, Morfolojik, İmmünohistokimyasal ve Moleküler Bulguların Dağılımları 41	
4.2. Klinik, Morfolojik, İmmünohistokimyasal ve Moleküler Bulguların Birbirleriyle İlişkisi.....	64
5. TARTIŞMA.....	76
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	88
KAYNAKLAR	94

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABC	Aktive B hücreli tip
BAFF	B hücre aktive edici faktör
BCL	B hücreli lenfoma
BV	Brentuximab vedotin
CART1	The paired-class homeobox-containing gen
CD	Diferansiyasyon kümesi
CHOP	Siklofosfomid-doksorubisin-vinkristin-prednizon
CMYC	Selüler MYC
CRP	C reaktif protein
DAPI	4'-6-diamidino-2-phenylidole
DLBCL	Diffüz büyük B hücreli lenfoma
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EBER	In situ hybridization for EBV-encoded small RNA
EBV	Epstein-Barr virüs
ECOG	Doğu Onkoloji İşbirliği Grubu performans değerlendirme
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FDC	Foliküler dendritik hücre
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
FOXP1	Forkhead Box P1
GCB	Germinal merkez B hücreli tip
NON-GCB	Germinal merkez dışı B hücreli tip
GCET1	Germinal center B cell-expressed transcript-1
GEP	Gen ekspresyon profili
GSK126	GSK2816126A
H&E	Hematoksilen Eozin
HEVs	Yüksek endotelial venül
HGAL	Human germinal center associated lymphoma
HGBL	Yüksek dereceli B hücreli lenfoma

HHV8	Human Herpes Virüs 8
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HTLV1	Human T-cell lymphotropic virus type 1
HLA-DR	Human lökosit antijen kompleksi
Ig	İmmünglobulin
IGH	İmmünglobulin ağır zincir
IGK	İmmünglobulin hafif zincir kappa
IGL	İmmünglobulin hafif zincir lambda
IL	İnterlökin
IPI	Uluslararası Prognostik İndeks
IBM	International Business Machines
LMO2	LIM-domain protein 2
LDH	Laktat Dehidrojenaz
MALT	Mukoza ilişkili lenfoid doku
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MHC2	Major Histocompatibility Complex molecules 2
MUM1/IRF4	Multiple Myeloma 1 / Interferon Regulatory Factor 4 protein
NaCl	Sodyum klorür
NCCN-IPI	Ulusal kapsamlı kanser ağı- Uluslararası Prognostik İndeks
NFkb	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural Killer
NOS	Daha ileri spesifiye edilemeyen
PAX5	Paired box protein 5
PDL1	Programlanmış ölüm ligandı 1
PET-CT	Pozitron Emisyon Tomografisi
R-CHOP	Rituksimab- siklofosfomid-doksorubisin- vinkristin-prednizon
SSC	Saline-Sodium Citrate
SSS	Santral sinir sistemi

TNF alfa

Tümör nekroz faktörü alfa

TNFR

Tümör nekroz faktör regülatör

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
2.1. Lenfatik sistemin vücuttaki dağılımı	3
2.2. Lenf nodunun anatomik yapısı	4
2.3. Lenf nodunun şematik görünümü, korteks ve folikül yapıları, parakorteks, medulla ve sinüzoidal bölümler	6
2.4. Lenf nodunun histolojik görünümü	7
2.5. Germinal merkez, histolojik görünümü; DZ: koyu (dark) zon, LZ: açık (light) zon, MZ: mantle zon	8
2.6. Moleküler alt tip sınıflamasında kullanılan algoritmalar	19
4.1. DLBCL, NOS olgularının dağılımı	41
4.2. Sekonder ektranodal tutulum bölgeleri	42
4.3. Primer ektranodal organ dağılımı	43
4.4. DLBCL, NOS olgularının morfolojik tiplere göre dağılımı	44
4.5. DLBCL, NOS olgularının moleküler alt tiplere göre dağılımı	45
4.6. DLBCL, NOS olgularında Ki-67 proliferasyon indeksi dağılımları	47
4.7. DLBCL, NOS olgularının Ann-Arbor Evreleri	51
4.8. Sentroblastik, monomorfik tip (H&E, x400)	52
4.9. Sentroblastik, polimorfik tip (H&E, x400)	52
4.10. Anaplastik tip (H&E, x400)	53
4.11. Sınıflandırılmayan tip, sentroblast-immünoblast arası hibrid özellikler içeren (H&E, x400)	54
4.12. DLBCL, NOS olgusunda CD20 pozitifliği (x400)	55
4.13. GCB alt tip, CD10 pozitifliği (x400)	55
4.14. GCB alt tip, BCL6 pozitifliği (x400)	56
4.15. ABC alt tip, MUM1 pozitifliği (x400)	56
4.16. CD30 ekspresyonu, %70 (x400)	57
4.17. DLBCL, NOS olgusunda BCL2, "Clone 124" negatifliği (x400)	58
4.18. BCL2 "Clone 124" negatif olguda BCL2 SP66 pozitifliği (x400)	58
4.19. DLBCL, NOS olgusunda CMYC protein pozitifliği (x400)	59
4.20. DLBCL, NOS olgusunda yüksek Ki-67 proliferasyon indeksi (x400)	59
4.21. FISH BCL2 normal hücre, çift füzyon sinyali (x1000)	60

4.22. FISH BCL2 normal hücre, çift füzyon sinyali	60
4.23. FISH BCL6 Translokasyon görüntüsü, tek alelde ayrı yeşil ve kırmızı sinyal (x1000)	61
4.24. FISH MYC Monozomi görüntüsü, tek füzyon sinyali (x1000)	62
4.25. FISH MYC Polizomi görüntüsü (x600)	62
4.26. FISH, MYC Polizomi, 3 ve daha fazla sayıda yeşil sinyal görüntüsü (x1000)	63

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
2.1. 2016 DSÖ Büyük B Hücreli Lenfoma Sınıflaması	10
2.2. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma, NOS Olgularında Görülen Mutasyonlar	21
2.3. Ann-Arbor Evrelemesi	24
2.4. ECOG Performans Durumu Sınıflaması	25
2.5. Uluslararası Prognostik İndeks (IPI)	25
2.6. Yaşa Uyarlanmış IPI (aa-IPI)- 60 Yaş ve Altı Hastalar İçin	25
2.7. Diğer Büyük B hücreli Lenfomalar, DSÖ 2016	28
3.1. Carnoy's fiksatif solüsyonları	35
3.2. Ön Yıkama Solüsyonları	35
3.3. Hibridizasyon Sonrası Kullanılan Solüsyonlar	36
3.4. Görüntüleme Sistemi Solüsyonu	36
3.5. Klinik, histopatolojik ve moleküler parametrelerin değerlendirilmesi	38
4.1. İmmünohistokimyasal belirleyicilerin ekspresyon oranları	44
4.2. DLBCL, NOS olgularında BCL2 ekspresyonu	45
4.3. DLBCL, NOS olgularında CMYC protein ekspresyonu	46
4.4. CD30 ile %1 ve %10 eşik değerlerine göre pozitiflik oranları	46
4.5. Ki-67 proliferasyon indeksi dağılımları	48
4.6. FISH ile BCL2, BCL6 ve MYC çalışma sonuçları	49
4.7. DLBCL, NOS olgularının IPI skoruna göre risk kategorileri	51
4.8. Nodal-Ekstranodal kategori ile BCL2 SP66 karşılaştırılması	64
4.9. Nodal-Ekstranodal kategori ile Ann-Arbor evre karşılaştırılması	65
4.10. Nodal-Ekstranodal kategori ile LDH düzeyi karşılaştırılması	65
4.11. Nodal-Ekstranodal kategori ile IPI skoru karşılaştırılması	65
4.12. Moleküler alt tip ile BCL2, "Clone 124" ilişkisi	66
4.13. Moleküler alt tip ile BCL2, SP66 ilişkisi	66
4.14. Moleküler alt tip ile double ekspresyon ilişkisi	67
4.15. BCL2, "Clone 124" ile Ann-Arbor evre ilişkisi	67
4.16. BCL2, SP66 ile Ann-Arbor evre ilişkisi	68
4.17. BCL2, "Clone 124" ile MUM1 ekspresyonu ilişkisi	68
4.18. BCL2, SP66 ile MUM1 ekspresyonu ilişkisi	68

4.19. BCL2, SP66 ile CD10 ekspresyonu ilişkisi	69
4.20. CMYC protein ekspresyonu ile CD10 ekspresyonu ilişkisi	69
4.21. CD30 (%1 eşik değer) ile BCL6 ekspresyonu ilişkisi	70
4.22. CD30 (%1 eşik değer) ekspresyonu ile MYC translokasyonu ve kopya sayısı artışının karşılaştırılması	70
4.23. CD30 ekspresyonu (%10 eşik değer) ile Ki-67 proliferasyon indeksi ilişkisi	71
4.24. BCL2 ve BCL6 FISH çalışma sonuçlarının karşılaştırılması	71
4.25. BCL6 ve MYC FISH çalışma sonuçlarının karşılaştırılması	72
4.26. BCL2 ve MYC FISH çalışma sonuçlarının karşılaştırılması	72
4.27. MYC FISH çalışma sonuçları ile Ann-Arbor evre karşılaştırılması	73
4.28. MYC FISH sonuçları ile LDH düzeyinin karşılaştırılması	73
4.29. BCL2 Clone 124 ekspresyonu ile BCL2 gen anormalliklerinin karşılaştırılması	74
4.30. BCL2 SP66 ekspresyonu ile BCL2 gen anormalliklerinin karşılaştırılması	74
4.31. BCL6 ekspresyonu ile BCL6 gen anormalliklerinin karşılaştırılması	75
4.32. CMYC protein ekspresyonu ile MYC gen anormalliklerinin karşılaştırılması	75

1. GİRİŞ

Diffüz büyük B hücreli lenfoma yetişkinlerde görülen Non-Hodgkin lenfomaların yaklaşık %35'ini oluşturmaktadır. Diffüz büyük B hücreli lenfoma kategorisi heterojen bir grup olup, farklı klinikopatolojik ve genetik özelliklere sahiptir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2016 lenfoma sınıflamasında, farklı klinikopatolojik ve moleküler özellikler temelinde yeni antitelere yer verilmiştir. Prognozu kötü etkilediği bilinen MYC ve BCL2 ve/veya BCL6 translokasyonu saptanan olgular yüksek dereceli B hücreli lenfoma olarak ayrı bir kategoride toplanmıştır. Prognostik farklılıkları olan özel lokalizasyonlara ait lenfomalar, özel tip büyük B hücreli lenfoma kategorisi altında toplanmıştır. Yüksek dereceli veya özel tip lenfoma olarak sınıflandırılmayan diffüz büyük B hücreli lenfomalar, ‘DLBCL, NOS’ olarak tanımlanmıştır. DLBCL, NOS kategorisi de kendi içinde heterojen bir grup olup, moleküler özelliklerine göre GEP analizi ve immünohistokimyasal (Hans) algoritmalarla GCB ve ABC alt tiplere ayrılmıştır. Böylece prognozu daha öngörülebilir hale getirmek amaçlanmıştır (1).

Bu çalışmada Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2018-2020 yılları arasında tanı almış, BCL2, BCL6, MYC gen anormalliklerinin FISH ile değerlendirilmesi sonucu ‘DLBCL, NOS’ kategorisine alınan 45 olgu, Hans algoritmasına göre GCB ve Non-GCB moleküler alt tiplere ayrılmıştır. Çalışmamızın amacı ‘DLBCL, NOS’ kategorisinde BCL2, BCL6, MYC protein ekspresyonları, double ekspresyon durumunu değerlendirmek ve FISH ile saptanan gen anormallikleri ile aralarındaki ilişkiyi araştırmaktır. Ayrıca son yıllarda hedefe yönelik anti-CD30 tedavi seçeneğinin gündeme gelmesi nedeniyle, olgularda CD30 ekspresyonunu da değerlendirmek, sıklığı ve prognostik önemini araştırmak amaçlanmıştır. Literatürde DLBCL üzerine yapılan çalışmalar genellikle yüksek dereceli B hücreli lenfoma ve özel tip büyük B hücreli lenfoma olgularını da içermektedir. Bizim olgu serimiz sadece DLBCL, NOS kategorisini içermektedir.

2. GENEL BİLGİLER

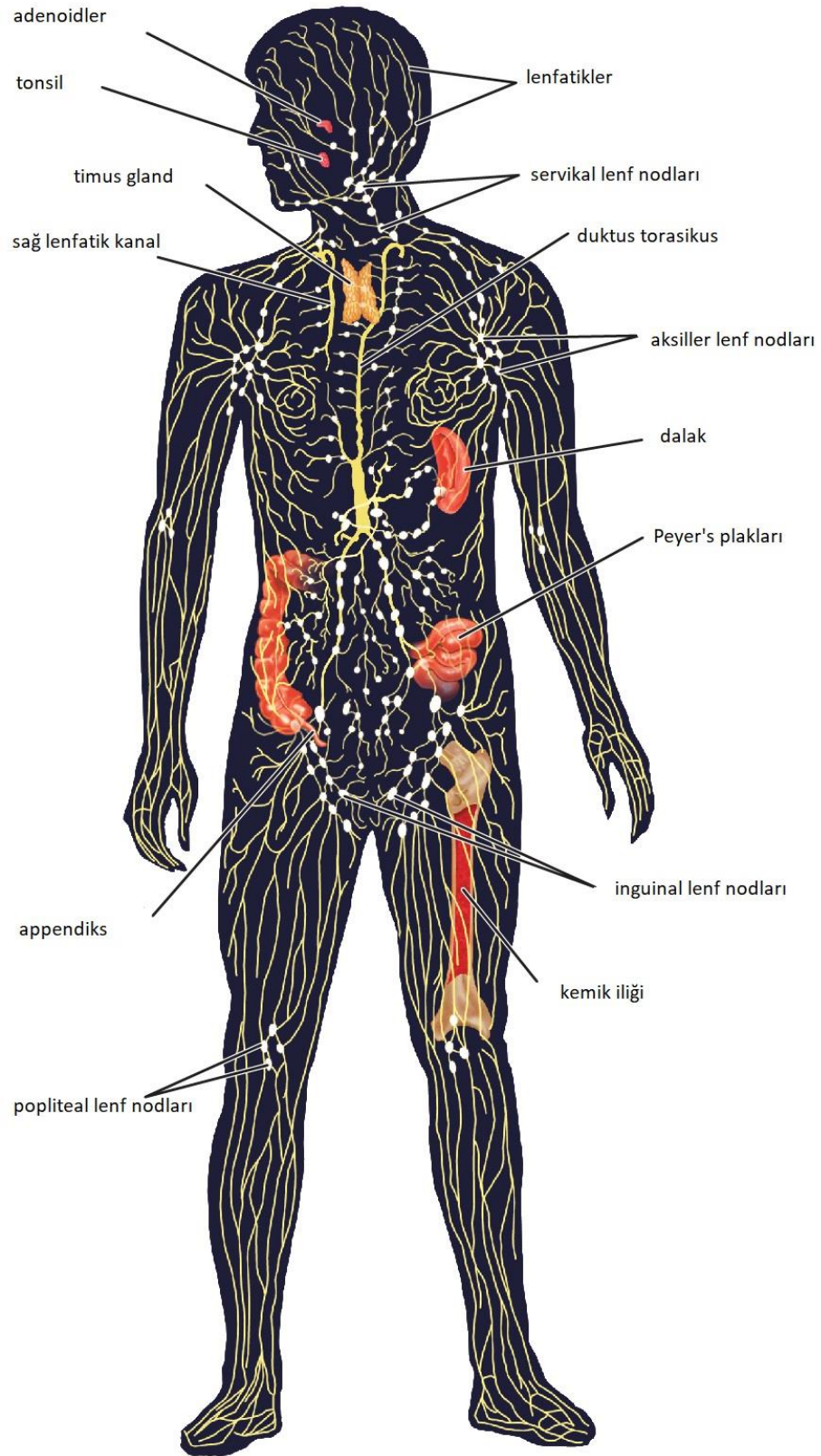
2.1. Lenfoid Sistem ve Organları

Lenfoid dokular prekürsör hücrelerin antijen ile tanışıp bağışıklık için yeterli hücreler haline geldikleri yerlerdir. Lenfositlerin diferansiyasyonları ve maturasyonları burada sağlanır. Bu lenfoid dokular immün sistemin bir parçası olup, selüler komponentleri fagositik hücreler (nötrofiller, monositler, histiyositler), lenfositler (T, B, NK) ve antijen sunucu hücreler (histiyositler, dendritik hücreler, B lenfositlerdir (2-4).

Lenfoid dokular primer ve sekonder olarak iki ana kategoride tanımlanmaktadır. Primer (santral) lenfoid organlar kemik iliği ve timus olup, lenfoid hücre üretimi, gelişimi ve olgunlaşması bu ortamlarda olmaktadır. Sekonder (periferik) lenfoid organlar ise lenf nodu, dalak, mukoza ilişkili lenfoid doku (MALT), Peyer plakları, adenoidler, tonsiller, nazal lenfoid dokudur (5).

2.2. Lenf Nodunun Embriyolojisi

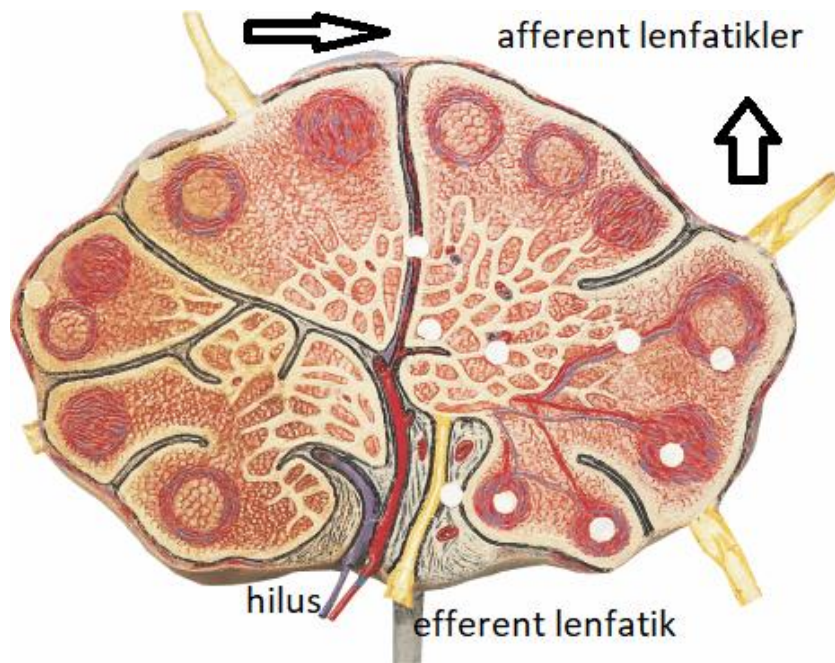
Lenf nodu gelişimi kapillerler ve mezenkimal hücreleri içeren bir mezenkimal yoğunlaşma şeklinde lenfatik kese oluşumuyla başlamaktadır. Gestasyonel 12-14. haftada geçici granülopoez ve eritropoez izlenmeye başlamakta olup ilk lenfoid hücreler ve farklılaşmamış blastlar görülebilmektedir. 14. gestasyonel haftada lenf nodunun korteks ve medulla bölümleri ortaya çıkmaya başlamakta ve 20. gestasyonel haftada kortekste küçük primer folikül yapıları seçilebilmektedir (2, 6).



Şekil 2.1. Lenfatik sistemin vücuttaki dağılımı

2.3. Lenf Nodunun Anatomisi

Lenf nodu organı en dıştan çevreleyen bir kapsül, kapsül altında subkapsüler sinüs ile ayrılan korteks, parakorteks ve medulladan oluşur. Medulla sinüs ve kordonlardan oluşur. Arteriol, venül ve lenfatik yapılarından zengin olup hilum ile devam etmektedir (7). Lenf nodları tüm vücutta lenfatik damarlar trasesinde yerleşmiştir. Lenfatik sıvıdaki antijen ve kemokinleri yakalayarak duyarlanmayı sağlarlar (5).



Şekil 2.2. Lenf nodunun anatomik yapısı

2.4. Lenf Nodunun Histolojisi

Lenf nodu kapsül, korteks, parakorteks, medulla ve hilum bölümlerinden oluşur. Kapsül dış kısmından lenf nodunu saran bağ dokusundan oluşur ve içeriye doğru trabeküla olarak adlandırılan uzantılara sahiptir. Hilum ven ve lenfatiklerin organdan çıktığı bölgedir (2).

Korteks, kapsülden subkapsüler sinüs ile ayrılan retiküler bir ağ yapısı içerisinde B lenfositlerden oluşmuş folikül yapılarının izlendiği kısımdır. Foliküller primer ve sekonder olarak ayrılmaktadırlar. Primer foliküllerdeki küçük yuvarlak

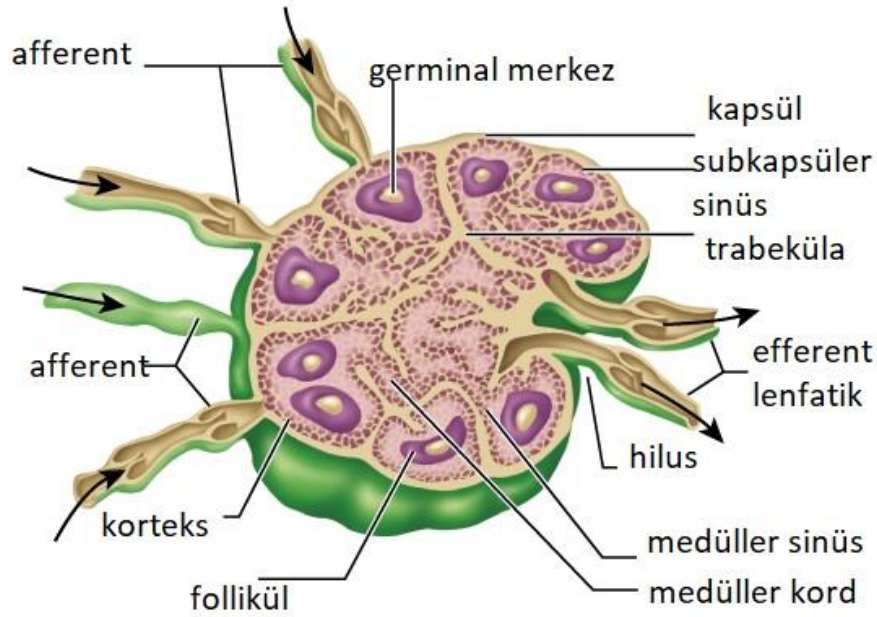
nükleuslu B lenfositlerin antijen ile uyarılmaları sonucu, germinal merkez içeren sekonder foliküller oluşmaktadır (2, 3).

Germinal merkez, T lenfosit bağımlı immün yanıtın meydana getirdiği özel bir lenfoid alandır. Antijen ile aktive olan B lenfositlerin çoğalması germinal merkezleri oluşturur ve bu merkez daha sonra koyu zon ve açık zon olarak polarize olur (Şekil 2.5). Koyu zon baskın olarak sentroblastlardan oluşur, mitoz sık görülebilir. Sentroblastlar orta ve büyük değişken boyutlu, oval ya da yuvarlak veziküler nükleuslu, bir iki adet küçük nükleol içeren hücrelerdir. Bu hücrelere 'tingible body' makrofajlar ve daha az sayıda sentrosit de eşlik etmektedir. Açık zon ise baskın olarak sentrositlerden oluşur. Ayrıca foliküler dendritik hücreler de sık olarak izlenmektedir. Diğer dendritik hücrelerin aksine foliküler dendritik hücreler mezenkimal hücrelerden köken alırlar, antijen cevabını organize etmede çok önemli rolleri vardır. Germinal merkezde yüksek proliferasyon olması ve germinal merkez hücrelerinde DNA kırıklarının meydana gelmesiyle lenfoid neoplazmlar gelişebilmektedir (1, 3).

Fenotipik olarak sentroblast ve sentrositler, CD19, CD20, CD22, CD79a gibi matür B hücre antijenlerini eksprese ederler. Ayrıca germinal merkez belirleyicisi olarak BCL6, LMO2, HGAL(GCET2) ve CD10 eksprese ederler. Sentroblastlar Ig genlerindeki somatik hipermutasyonlardan dolayı yüzey immünglobulinlerini kaybetmişlerdir ya da çok düşük seviyede eksprese ederler. Germinal merkez hücrelerinin diğer bir önemli özelliği de bir antiapoptotik molekül olan matür ve memory lenfositlerde eksprese edilen BCL2'nin downregüle olmasıdır. BCL2 eksprese etmezler ve bu nedenle apoptoz ile ölüme çok duyarlıdırlar. Ayrıca foliküler dendritik hücreler ve T lenfositlerle etkileşim için CD40, CD86, CD71, CD11a/18, CD29/49d eksprese ederler. FDC'nin salgıladığı IL-15 için de reseptör içerirler, böylece proliferatif sinyaller üretilir. BAFF (B cell activating factor) salgılanır, bu sayede BCL2 negatif germinal merkez hücreleri apoptozdan korunmuş olur (3, 8).

Germinal merkez ayrıca B lenfosit farklılaşmasının düzenlenmesinde önemli bir role sahip özel T hücreleri içerir. Bunlar 'T helper' ve 'T regülatör' hücreler olup CD4 eksprese ederler (3). Germinal merkezin sentrositleri BCL6 ekspresyonlarını kaybedip memory B hücreleri ve plazma hücrelerine farklılaşırlar.

Bu farklılaşma sonrası MUM1/IRF4 ekspresyonuna başlamaya başlarlar ki artık germinal merkez dışı hücre kategorisindedirler (1).



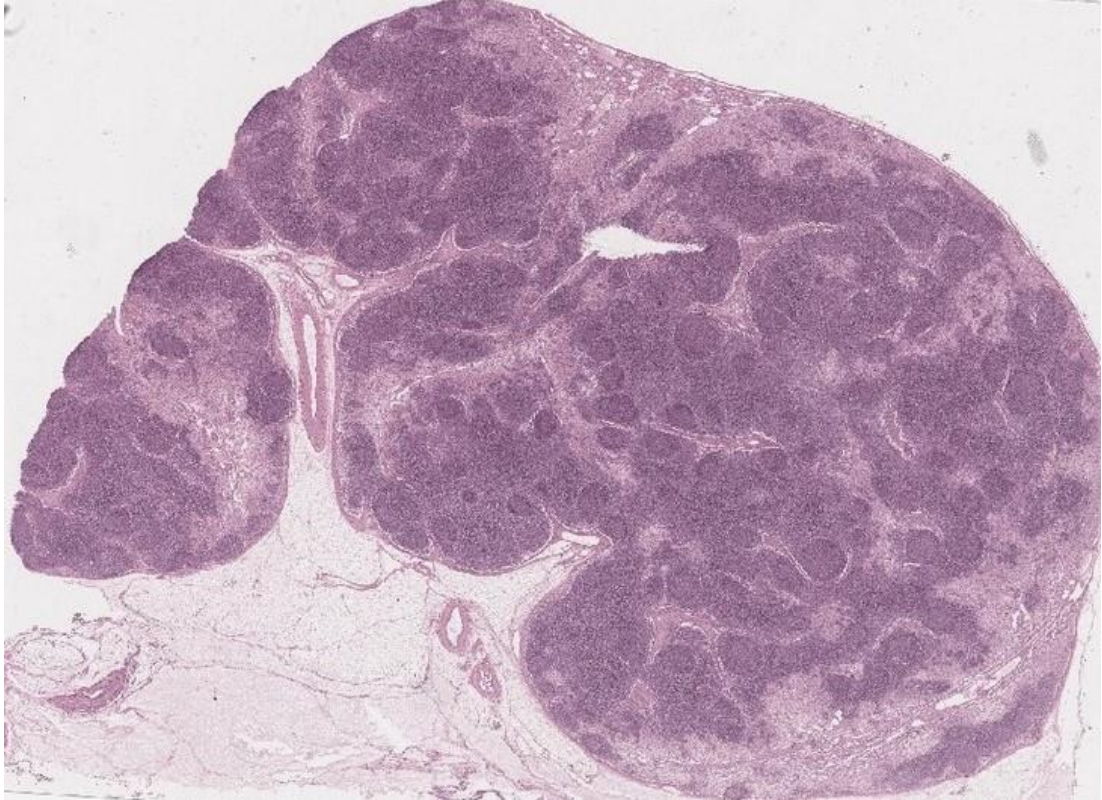
Şekil 2.3. Lenf nodunun şematik görünümü, korteks ve folikül yapıları, parakorteks, medulla ve sinüzoidal bölümler

Mantle zon ana komponent olarak germinal merkezin sıkıştırdığı primer folikülün küçük B lenfositlerinden oluşur. Germinal merkezi çepeçevre saran ince bir zon halinde izlenir. Marjinal zon ise foliküllerin etrafındaki daha geniş alana verilen isimdir. Marjinal zon B lenfositleri CD5, CD10, IgD ekspresyonlarını kaybetmişlerdir. CD20 gibi B lenfosit antijenleri ile IgM yüzey antijeni ekspresyon ederler (1, 3, 8).

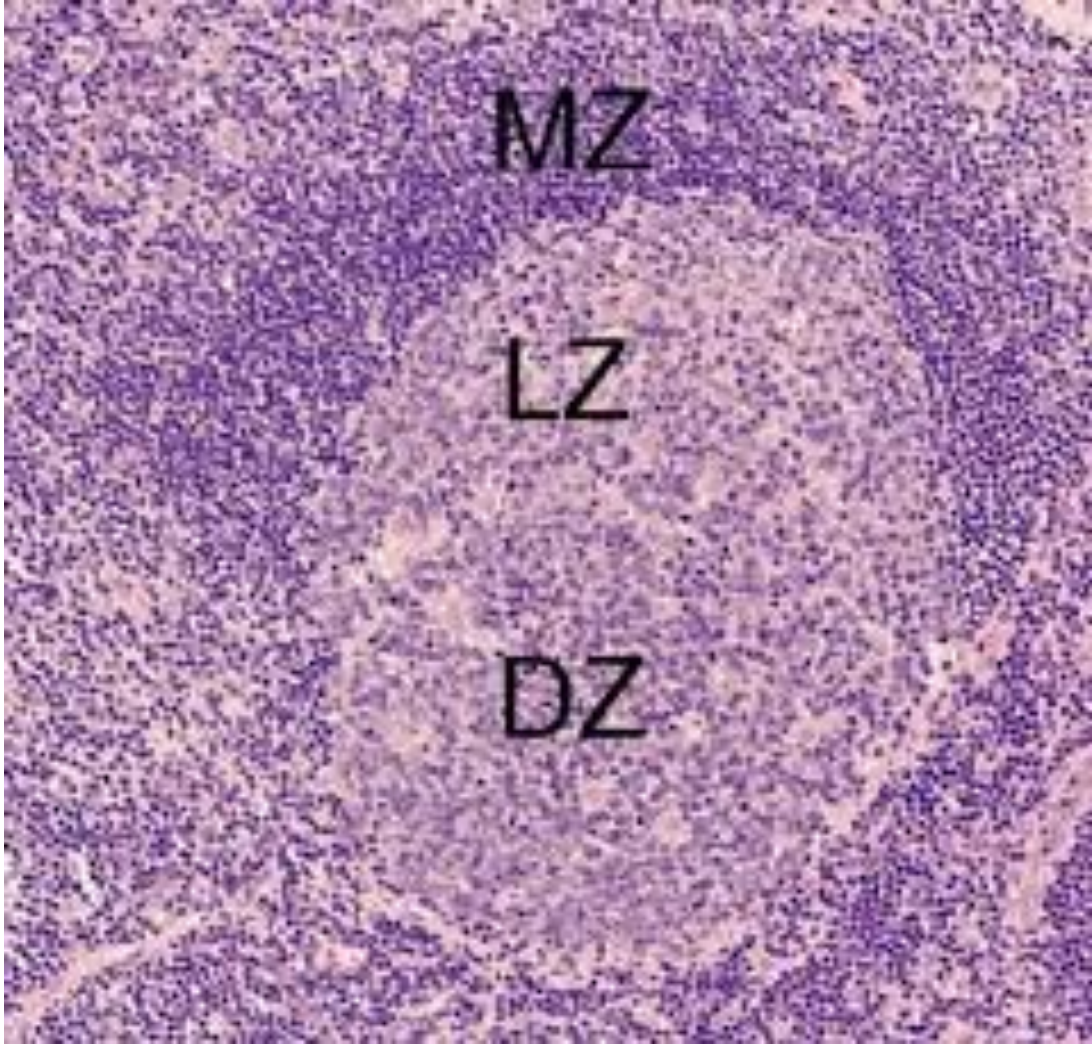
Parakorteks interfoliküler T lenfosit zonu olarak bilinmektedir. Matür T lenfositler ve bunların antijene duyarlanmasını sağlayan dendritik hücreler bulunur. Bu alandaki T hücreleri heterojen olmakla birlikte baskın olarak CD4 pozitif, ayrıca CD8 pozitif ve "T regülatör" hücrelerdir. İnterfoliküler alanlarda immünoblastik morfolojide bazı reaktif durumlarda artan sayıda B lenfosit bulunabilir. Bunlar matür B lenfosit belirleyicilerini ekspresyon ederler ancak germinal merkez belirleyicileri negatiftir. Ayrıca parakorteks "high endotelial venülleri (HEVs)" içerir. Endotelileri

şişkin görünümde olup lümenleri kapalı gibi görünmektedir. Bu venüller inflamasyonla uyarılmadığı durumlarda bile adezyon moleküllerini eksprese edebilmektedir (2, 3, 8).

Medulla bölgesi meduller kord ve sinüslerden oluşur. Kord yapıları lenfositler, plazma hücreleri, plazmablastlar ve plazmasitoid lenfositleri içerir. Sinüsler makrofajlar, lenfositler, plazma hücreleri, immünoblastlar ve bazı durumlarda nötrofilleri içerir (2).



Şekil 2.4. Lenf nodunun histolojik görünümü



Şekil 2.5. Germinal merkez, histolojik görünümü; DZ: koyu (dark) zon, LZ: açık (light) zon, MZ: mantle zon

2.5. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma, Daha İleriye Spesifiye Edilemeyen (NOS)

Diffüz büyük B hücreli lenfoma (DLBCL) orta ve iri boyutlu B lenfositlerin oluşturduğu diffüz patern özelliği gösteren bir neoplazmdır. Hücre nükleuslarının büyüklüğü makrofaj boyutunda ya da normal lenfositlerin iki katı ve daha büyük boyutlarda olduğu için büyük hücreli olarak adlandırılır. Diffüz büyük B hücreli lenfoma heterojen bir biyolojik gruptur. Çalışmalarla morfolojik ve moleküler subtipleri ile özel tipleri belirlenmiştir. Özel tip belirlenemeyen durumlarda olgular ‘‘Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma, Daha İleriye Spesifiye Edilemeyen (NOS)’’

olarak isimlendirilmektedir. Özellikle ‘Germinal merkez B hücreli tip’ ve ‘Aktive B hücreli tip’ olarak isimlendirilen moleküler alt tiplerin, olguların immünofenotipik ve prognostik özelliklerini belirleyici oldukları düşünülmektedir. Günümüzde ‘2016 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Lenfoma Sınıflaması’ referans kabul edilmekte olup, ilk defa moleküler alt tipler 2016 yılında güncellenen bu sınıflamada yer almıştır. Ayrıca ‘Yüksek dereceli B hücreli lenfoma’ yeni tanımlanan, sınıflamada ilk defa yer alan bir antite olarak karşımıza çıkmaktadır. Daha önce kullanımda olan 2008 DSÖ lenfoma sınıflamasında moleküler alt tipler yer almamakta ve özel lenfoma tiplerinin kategorizasyonunda farklılıklar mevcuttur. Bu konu ‘2.14. Bölüm’ de ayrıntılı olarak ele alınacaktır. ‘2016 DSÖ Büyük B Hücreli Lenfoma Sınıflaması’ ‘Tablo 2.1’ de ayrıntılı olarak gösterilmektedir (1).

Tablo 2.1. 2016 DSÖ Büyük B Hücreli Lenfoma Sınıflaması

DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMA, NOS
Germinal Merkez B Hücreli Alt Tip
Aktive B Hücreli Alt Tip
YÜKSEK DERECELİ B HÜCRELİ LENFOMA
Yüksek Dereceli B Hücreli Lenfoma, MYC ve BCL2 ve/veya BCL translokasyonu içeren
Yüksek Dereceli B hücreli Lenfoma, daha ileri spesifiye edilemeyen (NOS)
DİĞER BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMALAR
T lenfosit/histiyositten zengin büyük B hücreli lenfoma
Santral sinir sisteminin primer diffüz büyük B hücreli Lenfoması
Primer kutanöz diffüz büyük B hücreli lenfoma, 'leg type'
EBV pozitif diffüz büyük B hücreli lenfoma, NOS
Kronik inflamasyon ilişkili diffüz büyük B hücreli lenfoma
Lenfomatoid granulomatozis
IRF4 yeniden düzenlenimi içeren büyük B hücreli lenfoma
Primer mediastinal (timik) büyük B hücreli lenfoma
İntravasküler büyük B hücreli lenfoma
ALK pozitif büyük B hücreli lenfoma
Plazmablastik lenfoma
HHV8 pozitif diffüz büyük B hücreli lenfoma
Primer efüzyon lenfoması
B HÜCRELİ LENFOMA, SINIFLANDIRILAMAYAN
B hücreli lenfoma, Klasik Hodgkin lenfoma ile DLBCL arasında özellikler içeren

2.6. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Epidemiyolojisi

Diffüz büyük B hücreli lenfoma gelişmiş ülkelerde Non-Hodgkin lenfomaların yaklaşık %25-35' ini oluşturmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde bu oran daha da yüksek olup özellikle yaşlı yetişkinlerde gözlenmektedir. Her yaş

grubunda görülebilmekle birlikte, sıklıkla görüldüğü yaş grubu 7. dekadıdır. Erkek cinsiyette görülme sıklığı kadınlara oranla biraz daha yüksektir (1, 9-11). Etnik gruplar arasında bilinen bir farklılık yoktur, ancak doğu Avrupa ve Asya ülkelerinde görülme sıklığının kuzey Amerika ülkelerine göre daha yüksek olduğunu söyleyen kaynaklar mevcuttur (3, 10).

2.7. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Etyolojisi

Diffüz büyük B hücreli lenfomanın etyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Genellikle primer olarak ortaya çıktığı gözlenmekle birlikte, daha iyi prognozlu bazı lenfomalardan dönüşüm yoluyla sekonder olarak da gelişebilir. Diffüz büyük B hücreli lenfomaya dönüşebilen hastalıklar marjinal zon lenfoma, nodüler lenfosit baskın Hodgkin lenfoma ve kronik lenfositik lösemi/ küçük lenfosittik lenfoma olarak sayılabilir (1). Bazı durumlarda riskin arttığı söylenmektedir. Bu durumlar immünyetmezlik, kronik inflamatuvar hastalıklar, otoimmün hastalıklar, daha önceden yüksek riskli ilaçlarla tedavi öyküsüdür. İmmünyetmezlik en önemli risk faktörlerinden biridir ve bu olgularda lenfoma gelişiminde özellikle ‘‘Epstein-Barr Virüs (EBV)’’ ve ‘‘Human Herpes Virus 8 (HHV8)’’ etkilidir. EBV’nin etkili olduğu subtipler plazmablastik lenfoma, primer efüzyon lenfoması ve EBV pozitif diffüz büyük B hücreli lenfoma olarak sayılabilir (1, 3). İmmünyetmezlik kişinin beslenme durumu, genetik alt yapısı ile ilgili hastalıklar nedenli olabileceği gibi, ‘‘Human Immunodeficiency Virüs (HIV)’’ enfeksiyonu ya da immünsüpresif tedavi, organ transplantasyonu gibi iatrojenik nedenlerden dolayı gelişmiş olabilir. Kronik inflamasyon ve iritasyon da yine yüksek riskli durumlar arasındadır. Operasyon öyküsü, metal implantlar, sistemik lupus eritematozus ve romatoid artrit gibi kronik hastalıklar örnek olarak verilebilir (3).

2.8. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Klinik Özellikleri

Diffüz büyük B hücreli lenfoma nodal veya ektranodal hastalık olarak ortaya çıkabilmektedir. Lenf nodundan köken alan olgular ‘nodal’, lenf nodu dışındaki diğer dokulardan köken alan olgular ‘primer ektranodal lenfoma’ olarak adlandırılmaktadır. Lenf nodundan köken alan, ancak ektranodal dokuya da yayılımı olan olgular ‘sekonder ektranodal lenfoma’ olarak tanımlanmaktadır. Bu ayırım

altın standart ‘PET-CT’ görüntüleme yöntemidir (12). Olguların yaklaşık %40’ı primer ektranodal hastalık olarak başlamakla birlikte, nodal hastalık süresince olguların yaklaşık %60-70’inde ektranodal tutulum eşlik eder. En sık ektranodal tutulum bölgesi gastrointestinal sistem olarak bilinir. Ayrıca kemik, testis, dalak, waldeyer halkası, tükrük bezleri, tiroid, karaciğer, santral sinir sistemi, cilt, adrenal bez ve böbrek de diğer tutulum yerleridir. Özellikle santral sinir sistemi ve testis gibi bazı bölgelerin prognozu daha kötüdür. Olguların %10-25’inde kemik iliği tutulumu görülebilmektedir. Bir kısmı asemptomatik olabilmekle birlikte, kilo kaybı, ateş ve terleme gibi B semptomları da sıklıkla eşlik edebilmektedir (1, 3, 10, 13). Klinik özellikler prognozda büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle yaş ve bazı laboratuvar bulguları gibi klinik faktörleri temel alan IPI (International Prognostic Index) skorlaması hastanın risk düzeyini göstermede kullanılmaktadır. IPI skorlamasına prognostik özellikler anlatılırken ayrıntılı olarak yer verilmiştir (2.13. Bölüm).

2.9. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Morfolojik Özellikleri

Lenf nodu biyopsilerinde büyük lenfoid hücrelerin diffüz tutulum yaptığı görülmektedir. Koagülatif nekroz ve perinodal tutulum sıktır. Bazı olgularda skleroz ve koagülatif nekroz görülebilmektedir. Üç ana morfolojik varyant tariflenmiştir. Bunlar sentroblastik, immünoblastik ve anaplastik varyantlardır (1, 3, 14-16).

Sentroblastik varyant en sık görülen tiptir. Bu varyantı oluşturan hücreler orta ve iri boyutlu, bazofilik sitoplazmalı, 2 ya da 4 civarı nükleolus içeren, oval veya yuvarlak nükleusludur (1, 14). Bazı olgularda çok loblu, köşeli veya yarıklanmış nükleus görülebilmektedir (3). Sentroblastik varyant olarak değerlendirilen olgular neredeyse tamamen sentroblastik hücre morfolojisinde (>%90) ise monomorfik tip olarak tanımlanmaktadır. Sentroblastik hücrelerin %90’ın altında olduğu ve immünoblastik hücrelerin de eşlik ettiği olgular polimorfik tip olarak tanımlanmaktadır. Sentroblastik varyant olgular sıklıkla moleküler alt tiplerden, germinal merkez B hücreli alt tipe aittir (1, 3, 8, 16, 17).

İmmünoblastik varyantın hücreleri tek, merkezi yerleşimli, belirgin nükleolusa sahiptir ve hücrelerin %90’dan fazlası bu morfolojide izlenmelidir (18). Eğer immünoblastik morfoloji %90 sınırının altında kalıyorsa ve sentroblastik morfolojide hücreler çoğunlukta ise böyle bir olgu sentroblastik varyant (polimorfik)

olarak değerlendirilmelidir. Bazı olgularda immünoblastların plazmasitoid görünümde olabileceği belirtilmektedir. İmmünoblastik varyantın sıklıkla CD10 eksprese ettiği ve MYC translokasyonu ile ilişkili olduğu söylenmektedir (1, 3, 8, 16).

Anaplastik varyantın hücrelerinin çoğu çok iri boyutlu hücrelerdir. Çok nükleuslu veya nükleusları çok loblu, bizaar, poligonal şekilli, koyu kromatinli izlenen bu varyantta belirgin nükleol görünümü dikkati çekmektedir (1, 3, 8). Hodgkin lenfomanın ‘Reed Sternberg’ hücreleri ve anaplastik büyük hücreli lenfomanın hücreleri ile benzer görünümde olabileceğinden, bu hastalıklarla ayırım önemlidir (3, 19).

Nadir olarak görülen diğer morfolojik varyantlar iğsi hücreli, taşlı yüzük benzeri hücreler içeren, miksoid stromaya sahip, fibriler matris ve rozet formasyonu içeren, alveoler morfolojiye sahip, kristal depolayan histiyositler içeren, mikrovillus benzeri çıkıntılar içeren, artmış eozinofil içeren ve sinüzoidal CD30 pozitif tipler olarak tanımlanmıştır. Bazı durumlarda ise hücre tipi sentroblast ve immünoblast benzeri ara bir formda olup ‘intermediate’ morfolojide görülebilmektedir. Bu gibi durumlarda ise olgular herhangi bir varyant içerisinde değerlendirilememekte ve sınıflandırılmayan grupta yer almaktadır (3, 8).

2.10. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma İmmünofenotipik Özellikleri

Neoplastik hücreler CD19, CD20, CD22, CD79a ve PAX 5 gibi B hücre belirleyicilerini eksprese ederler. Bazı durumlarda bu belirleyicilerden birkaçında boyanmada kayıplar olabilir. Yüzey immünglobulini sıklıkla IgM’dir.

PAX5, B hücre diferansiyasyon yolağında çok önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Erken evrelerde CD19 dan hemen sonra eksprese edilmeye başlar. CD79a ve MHC II antijenleri de eksprese edilir, bu belirleyiciler B hücresinin hayatı boyunca kalıcı olur. CD20 ekspresyonu pre-B hücrelerinde zayıf olarak başlar, matürleştğinde yoğun olarak eksprese edilir. CD45 de CD20’dan sonra eksprese olan belirleyiciler arasındadır (3).

CD10 (CALLA) tip II yüzey glikoproteinidir. Normal ve neoplastik birçok hücrede boyanabilmektedir. Prekürsör B hücreleri, germinal merkez B hücreleri, germinal merkez ‘T helper’ lenfositleri ve granüositlerde fizyolojik olarak

boyanabilmektedir. Eksprese olduğu hematolojik neoplazmlar arasında çoğu B ve T hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma, foliküler lenfoma, Burkitt lenfoma, bazı diffüz büyük B hücreli lenfomalar ve anjioimmünoblastik T hücreli lenfoma yer almaktadır (7). Ayrıca renal, endometrial, hepatosellüler karsinom gibi bazı epitelyal maligniteler ile bazı vasküler ve stromal tümörlerin de CD10 eksprese edebileceği bilinmektedir (7, 20, 21). CD10 diffüz büyük B hücreli lenfomada moleküler subtiplerin belirlenmesinde, özellikle Hans algoritması da dahil birçok algorithmada önemli bir yere sahiptir. Germinal merkez B hücre tipinde eksprese olup, bu tipin tanısında kullanılan en önemli immünohistokimyasal belirleyicilerden biridir (3). Diffüz büyük B hücreli lenfomada CD10 ekspresyonunun, BCL2 ekspresyonu ve BCL2 translokasyonu ile korele olabileceğini belirten çalışmalar da mevcuttur. BCL2 ve CD10 ko-ekspresyonunun yaşam süresi, prognoz ve klinik özellikler ile ilişkisi incelenmiş ve daha kötü prognoza sahip oldukları gözlenmiştir (3, 21, 22).

BCL6 bir nükleer çinko bağımlı transkripsiyon faktörü olup, germinal merkez gelişiminin en önemli göstergesidir. Fizyolojik olarak germinal merkez B hücrelerinde ve germinal merkez "T helper" hücrelerinde ve nadir T hücre gruplarında eksprese olmaktadır (3, 7). Sentroblastlar, sentrositler, germinal center T hücreleri pozitif boyanırken; aktive B, memory B, plazma hücreleri ve mantle hücreleri BCL6 negatiftir. Diffüz büyük B hücreli lenfomaların yaklaşık %70'inde eksprese edilmektedir (3). Hans algoritması ile moleküler subtiplerin belirlenmesinde kullanılan üç belirleyiciden biridir. Neoplastik hücrelerin %30 ve daha fazlasında ekspresyon varsa pozitif kabul edilir (1).

MUM1/IRF4 germinal merkez B hücre diferansiyasyonunun son aşamasında post-germinal B hücre gelişiminde görevli bir transkripsiyon faktörüdür. İmmün cevabın düzenlenmesinde önemli bir rolü vardır. Fizyolojik olarak plazma hücrelerinde ve plazmablastlarda, aktive T hücrelerinin az bir kısmında eksprese edilir. Eksprese olduğu neoplastik lezyonlar arasında plazma hücreli ve plazmablastik neoplazmlar, lenfoplazmatik lenfoma, diffüz büyük B hücreli lenfoma ve bazı diğer B ve T hücreli lenfomalar yer almaktadır (7). Diffüz büyük B hücreli lenfomada moleküler subtiplerin belirlenmesinde Hans algoritmasında kullanılan bir diğer belirleyicidir. Ayrıca Hans algoritması ile subtip belirlenemeyen

durumlarda kullanılabilen diğer algoritmalar olan Choi, Muris ve Tally algoritmalarında da kullanılmaktadır (1, 3, 7).

BCL2 fizyolojik olarak germinal merkez dışı B hücreleri, çoğu T hücre ve plazma hücrelerinde eksprese edilir. Çoğu foliküler lenfomada, bazı diffüz büyük B hücreli lenfoma vakalarında ve diğer çoğu lenfoma, lösemi vakalarında ekspresyonu görülür. Pratikte özellikle foliküler lenfomayı, reaktif foliküler hiperplaziden ayırt etmek için kullanılır (7). Hücre siklusunda yer alan apoptozu düzenleyen çok önemli bir regülatör proteindir. 18. kromozom (18q21) üzerinde yer alan BCL2 lokusu tarafından kodlanmaktadır. İmmünohistokimyasal boyamada kullanılan BCL2 antikoruyla bağlı olarak diffüz büyük B hücreli lenfomaların %47-84'ünde ekspresyonu saptanmaktadır (1). Bu konuda yapılan çalışmalarda, germinal merkez B hücre benzeri tipte ve aktive B hücreli moleküler tipteki olgularda farklı mekanizmalarla sık eksprese olabileceği belirtilmektedir (23, 24). Pozitif olarak değerlendirilmesi için eşik değeri çoğu kaynak tarafından %50 olarak kabul edilmektedir (1, 16, 23, 25). BCL2 gen lokusunda gözlenen translokasyon ve diğer mutasyonlar, çoğu zaman immünohistokimyasal BCL2 protein ekspresyonu ile korele değildir. BCL2 antikorusunun immünohistokimyasal boyamada kullanılan 'clone 124', 'clone E17', 'SP66' gibi farklı epitoplara sahiptir. Bu epitopların aynı olguda ekspresyonları arasında farklılıklar gözlenmektedir. 'Clone 124' olarak adlandırılan epitopun, FISH ile BCL2 translokasyonu saptanan olguların çoğunda yanlış negatiflik gösterdiği ve moleküler yöntemlerle korelasyonunun zayıf olduğu gösterilmiştir. 'SP66' ve 'clone E17' ise daha yeni iki tavşan monoklonal antikoru olup, moleküler yöntemler ile korelasyonun daha yüksek olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (26-31).

MYC proto-onkogen ailesi 'C-MYC (MYC), N-MYC (MYCN), L-MYC (MYCL)' normal hücrelerde birçok fonksiyonun düzenlenmesinde görev alan onkogenik potansiyeli yüksek transkripsiyon faktörleridir. DNA replikasyonunda doğrudan görev almaktadır. Birçok karsinomda farklı aktivasyon mekanizmaları ve mutasyonlar ile patogeneizde yer almaktadır. Özellikle C-MYC (MYC), B hücre gelişiminde çok önemli bir yere sahiptir ve 8. kromozom üzerinde lokalizedir. MYC translokasyonu hematolojik neoplazmlarda değişen sıklıkta gözlenmektedir (32). Özellikle Burkitt lenfoma ve agresif B hücreli lenfomalarda karakteristiktir.

İmmünohistokimyasal olarak ekspresyonu her zaman translokasyon ile korele değildir. Ancak her iki durumda da prognozu kötü etkilediği belirtilmektedir. Diffüz büyük B hücreli Lenfoma olgularında %30 sıklıkla ekspresyonu gözlenebilmektedir. Pozitif kabul etmek için genellikle %40 ve üzeri ekspresyonu istenmektedir. BCL2 ile birlikte ekspresyonları 'double expressor' lenfoma olarak adlandırılmaktadır (1, 16, 25, 32).

CD30 'tumour necrosis factor receptor (TNFR) superfamily' ailesinin bir üyesidir. Ki-1 olarak da bilinen bir aktivasyon faktörüdür. NFkb ve MAPK ailesine ait proteinlere etki ederek bu yolların düzenlenmesinde görev aldığı belirtilmektedir (33-35). Fizyolojik olarak parafoliküler bölgedeki aktive B ve T hücreleri tarafından eksprese edilebilir. EBV, HIV, HTLV-1 ile enfekte lenfositlerde boyandığı bilinmektedir. Neoplastik lezyonlar arasında özellikle klasik Hodgkin lenfomada "Reed Sternberg" hücrelerinde ve anaplastik büyük hücreli lenfomada ekspresyonu karakteristiktir. Ayrıca bazı B ve T hücreli lenfomalarda da boyanabildiği bilinmektedir (7, 16, 35). Diffüz büyük B hücreli lenfomada heterojen bir ekspresyonu vardır, lenfoma hücrelerinden bir kısmında, olguların yaklaşık %10-20'sinde boyanabilmektedir (1, 3, 35, 36). EBV pozitif olgularda ise ekspresyon sıklığı %90'ı bulmaktadır. CD30 pozitif olgular için spesifik bir subtip yoktur. Aktive B hücreli ya da germinal merkez B hücre tipinde ve herhangi bir morfolojik paternde olabilmektedir (3, 37). Özellikle morfolojik tiplerden anaplastik varyantta ekspresyonu bilinmektedir (1). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda germinal merkez B hücre tipinde ve daha genç yaştaki olgularda daha sık eksprese olduğu bildirilmiştir (36, 38).

Diffüz büyük B hücreli lenfomada CD30 ekspresyonunun prognostik önemi ve pozitif kabul etmek için boyanmanın eşik değeri konularında, kabul edilebilir kesin bir görüş yoktur. Ekspresyonunun iyi prognostik faktör kabul edilebileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur (36, 38-40). Bazı çalışmalar ise kötü prognostik faktör olduğunu savunmaktadır (41). %10 veya %20 boyanma oranlarının, pozitiflik için eşik değer kabul edilmesi önerilmektedir (35-38, 42). CD30 ekspresyonu olan olgularda standart tedaviye ek olarak hedefe yönelik monoklonal antikör tedavisi önerilmektedir. Brentuximab vedotin (BV) bu amaçla kullanılan antikördür. CD30 pozitif klasik Hodgkin lenfoma ve anaplastik büyük hücreli lenfomada tedavide

kullanılmakta olup diffüz büyük B hücreli lenfomada kullanılmasının klinik yararı bildirilmektedir. Tedavi uygulanacak olgular için '>%0' boyanma oranı yeterli görülmektedir (16, 36, 43-45).

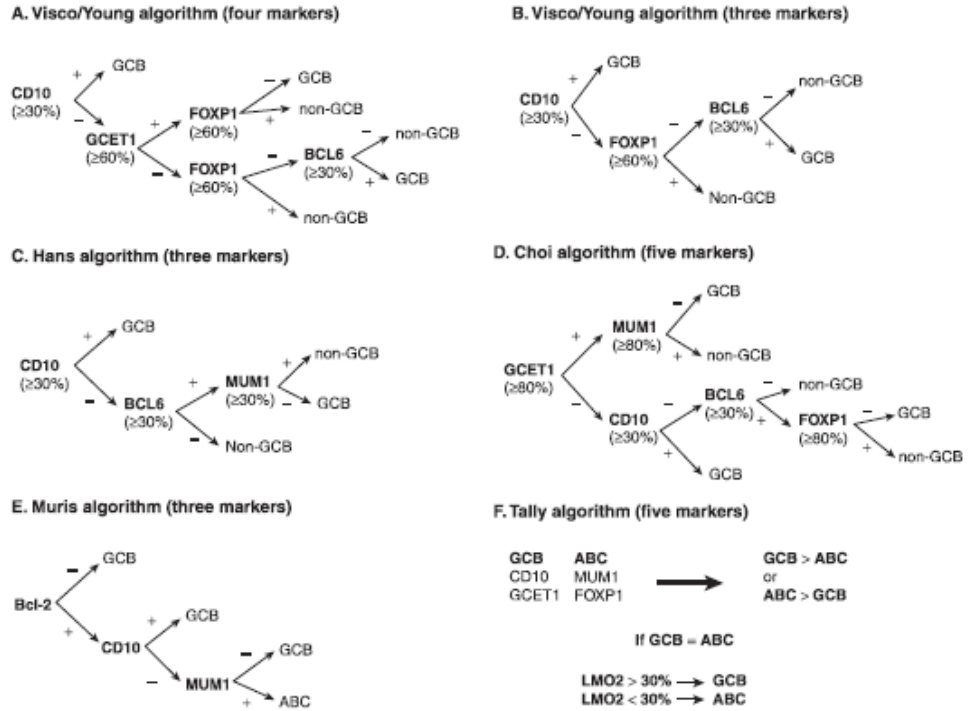
EBV pozitifliği diffüz büyük B hücreli lenfoma olgularının yaklaşık %3-4 oranında görülebilmektedir. Bu olgular sıklıkla ileri yaşta ve aktive B hücreli tiptedir. Hücrelerin çoğu EBV pozitif ise 'EBV pozitif DLBCL' olarak tanımlanmalı ve özel bir tip olduğu için DLBCL, NOS kategorisinin dışında tutulmalıdır. Bu tanı EBER (In situ hybridization for EBV-encoded small RNA) ile konulmalıdır. EBV pozitif olgularda yaklaşık %90 sıklıkla CD30 ekspresyonu da izlenmektedir (1, 3).

2.11. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomada Hücre Orjini ve Moleküler Alt Gruplandırma

GEP (Gene Expression profiling) imza profili, hücre kökeni ile birlikte, tümör mikroçevresini de gösteren 'stromal 1' ve 'stromal 2' olarak adlandırılan bir grup geni temel alan, biyolojik prognositik bir modeldir. Risk düzeyini, prognozu öngörmekte çok başarılıdır ve 'International Prognostic Index (IPI)' ile birlikte kullanılmaktadır. 'Gene Expression profiling (GEP)' çalışmaları diffüz büyük B hücreli lenfomada iki farklı gen ekspresyon paterni olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bunlar germinal merkez B hücreli tip (GCB) ve aktive B hücreli tip (ABC) olarak isimlendirilmiştir. Sınıflandırılabilen olguların yaklaşık %60'ının GCB, %40 ABC tip olduğu bilinmektedir (1). ABC tipte sıklıkla B hücre reseptör ve NFkB yollarında aktive edici mutasyonlar saptanırken, GCB tipte daha çok apoptotik yolların düzenlenmesinde ve çalışmasında bozukluklar saptanmıştır. Ayrıca destekleyen klinik çalışmalarla GCB tipte CHOP ve R-CHOP tedavi protokolleri ile sağkalımın daha yüksek olduğu gösterilmiştir. ABC tipte ise özellikle MYC ve BCL2 koekspresyonunun (double expressor lymphoma) sık görülmesi de etkili olmakla birlikte bu tedavi rejimlerine iyi yanıt alınmadığı ve sağ kalımın daha düşük olduğu belirtilmektedir. Bu teorinin doğru olmadığını savunan çalışmalar da mevcuttur. Ancak daha kapsamlı bir görüş olarak çalışmalar arasındaki sonuç farklılıklarının nedeninin, 'unclassified' olarak isimlendirilen sınıflandırılmayan bir moleküler grup varlığı olduğuna inanılmaktadır. Bazı vakaların GCB ya da ABC tip olarak isimlendirilemeyeceği ve üçüncü bir grup olarak kabul edilip,

sınıflandırılmayan grup denilmesi önerilmektedir (%10-15). Bu fikir temelinde yapılan çalışmalarda moleküler alt tip ile prognoz arasında daha yüksek bir korelasyon saptanmış olup, GCB tipin en iyi prognoza sahip olduğu belirtilmiştir (1, 16, 25, 39, 46-49).

Diffüz büyük B hücreli lenfomada moleküler alt tip tayinine yönelik çok sayıda algoritma önerilmektedir. Choi, Tally, Muris, Hans, üç ve dört belirleyicili Visco/Young algoritması bu ayrımda kullanılabilir (Şekil 2.6). Bunlar arasında en çok kullanılan, kabul gören ve uygulanabilirliği kolay olan Hans algoritmasıdır. Ancak GEP analizi ile sadece %80 korelasyon gösterdiği bilinmektedir. Choi, Visco/Young ve Tally algoritmelerinin ise daha yüksek düzeyde uyumluluk gösterdiği belirtilmektedir (1, 3, 16, 25, 49-54). Hans algoritmasında CD10, BCL6 ve MUM1 olmak üzere üç belirleyici kullanılmaktadır. Bu immünohistokimyasal belirleyicilerin pozitif olarak kabul edilmesi için %30 ve üzerinde ekspresyon gözlenmelidir. İlk olarak CD10 ekspresyonu değerlendirilerek pozitif izlenmesi halinde olgu GCB tip olarak kabul edilmektedir. Negatif olması durumunda diğer belirleyiciler olan BCL6 ve MUM1 ekspresyonuna bakılmakta, MUM1 pozitif olgular Non-GCB tip olarak değerlendirilmektedir. BCL6 pozitif, MUM1 negatif ise olgu GCB tip kategorisine alınır. Üç belirleyicinin de negatif olması gibi bazı durumlarda, Hans algoritması alt tip tayininde yetersiz kalmaktadır. Böyle olgularda LMO2 ve GCET1 gibi germinal merkez orjinini desteklemeye yönelik ek belirleyicilerden yardım alınmalıdır. Muris ve Visco/Young algoritması üç belirleyici kullanan diğer algoritmelerdir. Muris algoritmasında sırasıyla BCL2, CD10, MUM1 belirleyicileri kullanılırken, Visco/Young algoritmasında CD10, FOXP1, BCL6 belirleyicileri ile alt tip tayini yapılmaktadır. Visco/Young algoritmasının GCET1 de eklenerek geliştirilmiş dört belirleyici içeren şekilde kullanımı da mevcuttur. Son olarak CD10, GCET1, MUM1, FOXP1, LMO2 belirleyicilerini kullanan, beş belirleyicili tek algoritma olan Tally algoritması da gerekli durumlarda kullanılabilir (3, 8, 53-55). Bahsedilen altı algoritma de şematize edilerek 'Şekil 2.6' da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Moleküler alt tip sınıflamasında kullanılan algoritmalar

2.12. Genetik Özellikler

Diffüz büyük B hücreli lenfomada bazı somatik mutasyonlar, immüoglobulin ağır (IgH) ve hafif (IgK ve IgL) zincirlerinde yeniden düzenlenme (rearrangement)/ translokasyon sıklıkla görülebilmektedir. Bunlar arasında en sık rastlanan 14q32 konumunda yer alan immüoglobulin ağır zincir (IgH) lokusunun yeniden düzenlenme durumudur ve translokasyon partneri olarak genellikle BCL6, BCL2 veya MYC'e eşlik eder (56).

BCL2 geni 18q21 üzerinde lokalizedir. Apoptoz inhibisyonu ve hücre siklusunun düzenlenmesinde çok önemli bir yere sahiptir. Aşırı ekspresyonu durumunda apoptozun inhibisyonuna neden olur, hücre öldürülemez ve yaşam süresi uzar. BCL2-IgH yeniden düzenlenme/translokasyonu, t(14;18)(q32;q21) foliküler lenfomalarda karakteristiktir, diffüz büyük B hücreli lenfomada da %20-30 oranında görülebilmektedir. Daha çok germinal merkez B hücreli tipte (%40) gözlenir ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Aktive B hücreli tipte ise %5 oranında saptanabilmektedir. BCL2 translokasyonu saptanan olgularda BCL2 ve CD10 immünohistokimyasal

olarak ekspresyonu sık görülebilmekle birlikte, tam bir korelasyon bulunmamaktadır (1, 16, 57).

BCL6 (3q27) translokasyonu/ yeniden düzenlenmesi diffüz büyük B hücreli lenfomada en sık görülen translokasyon tipi ve moleküler değişikliktir. Yaklaşık %30 olguda görülmekle birlikte, aktive B hücreli alt tipte daha sık gözlemlendiği bilinmektedir (1, 16). Translokasyonun karşılıklı gerçekleştiği en sık lokalizasyon IgH (14q32) olup, t(3;14)(q27;q32) olarak isimlendirilmektedir. Nadiren diğer translokasyon partnerleri kromozom 22q11 (IgL lokusu), kromozom 2p12 (IgK lokusu) ile de gerçekleşebilmektedir (58).

MYC lokusu kromozom 8q24 üzerinde bulunmaktadır. Translokasyonu durumunda en sık partneri IgH lokusu olup t(8;14)(q24;q32) olarak gösterilir. Nadiren IgK, IgL ya da immünoglobulin dışında başka lokalizasyonlar da söz konusu olabilmektedir. Esas olarak Burkitt lenfomada görülmekte olup, diffüz büyük B hücreli lenfomaların %8-14'ünde bulunabilmektedir. MYC translokasyonu görülen vakaların yarısında BCL2 ve/veya BCL6 translokasyonu da eşlik edebilmektedir. Bu olgular yüksek dereceli B hücreli lenfoma olarak sınıflandırılmakta olup birlikte bulunan translokasyon sayısı ile ilişkili olarak "double hit" veya "triple hit" olarak isimlendirilmektedir. Sadece MYC translokasyonu görülen tipik diffüz büyük B hücre morfolojisindeki olgular, "diffüz büyük B hücreli lenfoma, NOS" olarak kategorize edilmektedir (1, 16, 25).

DLBCL, NOS olgularında BCL2, BCL6, MYC translokasyonlarının yanısıra kopya sayısı değişiklikleri de sıklıkla görülebilmektedir. Kopya sayısı değişikliklerinin prognoza etkisi kesin olarak bilinmemektedir. Bazı çalışmalarda BCL2 ve MYC kopya sayısı değişikliklerinin %20-25 sıklıkta, özellikle ABC tipte görülebileceği ifade edilmektedir (59-62). ABC tipte MYC mutasyonu ile birlikte gözlenen BCL2 kopya sayısı artışının kötü prognostik faktör olarak değerlendirilebileceğini, BCL2 kopya sayısı değişikliklerinin MYC mutasyonu, MYC kopya sayısı değişikliklerinin ise BCL2 mutasyonu ile birlikteliğinin daha sık görüldüğünü bildiren yayınlar mevcuttur (49). Başka bir çalışmada ise BCL2 ve MYC kopya sayısı artışının 'Double Hit' lenfomalara benzer şekilde kötü prognostik faktör olduğu bildirilmiştir (63). Bu çalışmaya benzer şekilde Li ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada BCL2 translokasyonu/ MYC kopya sayısı artışı, MYC

translokasyonu/ BCL2 kopya sayısı artışı ve MYC/BCL2 kopya sayısı artışı olan olgular üç grup halinde incelenmiştir. Bu olguların ‘Atipik Double Hit’ olarak isimlendirilmesi önerilmiş ve kötü prognoza sahip olduğu bildirilmiştir (64). Quesada ve arkadaşlarının daha sonra, daha büyük bir olgu serisinde yaptıkları çalışma da bu sonucu destekler niteliktedir (16, 65). Son yıllarda Ma ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise çift kopya sayısı değişikliği içeren olguların prognozları, ‘Double Hit’ lenfoma olgularına göre daha iyi, kopya sayısı değişikliği içermeyen DLBCL, NOS olgularıyla karşılaştırıldığında ise daha kötü olarak bildirilmiştir (66). Huang ve arkadaşlarının çalışmasında da benzer şekilde kötü prognoza sahip oldukları için MYC, BCL2 ve BCL6 lokuslarının ikisinde kopya sayısı değişikliği veya translokasyona eşlik eden kopya sayısı değişikliği ‘Atipik Double Hit’, her üç lokusta da kopya sayısı değişikliği veya translokasyona eşlik eden kopya sayısı değişikliği ‘Atipik Triple Hit’ olarak adlandırılmıştır (67).

Diffüz büyük B hücreli lenfoma olgularında 2p16, 9p24, kromozomlarında kazanımlar (gain) ve 1p36, 6q21, 9p21 kromozomlarında kayıpların (delesyon) da sıklıkla izlendiği görülmüştür. Bunlar dışında çeşitli genlerde tekrarlayan mutasyonlar da görülebilmektedir. Bahsedilen mutasyonların moleküler alt tiplere göre görülme sıklıkları da belirtilerek ‘Tablo 2.2’ da özetlenmiştir (1).

Tablo 2.2. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma, NOS Olgularında Görülen Mutasyonlar

Yeniden Düzenlenme /Translokasyon	ABC Tip	GCB Tip
BCL2	<%5	%40
BCL6	%25-30	%15
MYC, single hit	%5-8	%5-8
PDL1/2	Nadir	Nadir
C2TA	Nadir	Nadir
TBL1XR1	%0	%5

Kopya sayısı değişiklikleri	ABC Tip	GCB Tip
1p36.32 delesyonu	%10	%30
2p16 kazanımı/amplifikasyonu	Nadir	%30
3q27 kazanımı/amplifikasyonu	%45	%15-20
6q21 delesyonu	%45	%25
9p21 delesyonu	%40	%20
9p24.1 kazanımı/amplifikasyonu	Nadir	Nadir
18q21.3 kazanımı/amplifikasyonu	%55	%15

Tekrarlayan Mutasyonlar	ABC Tip	GCB Tip
EZH2	Nadir	%20-25
GNA13	Nadir	%25
MLL2	%35	%40
TP53	%25	%20
MEF2B	%5	%15-20
SGK1	%5-10	%15-20
CREBBP	%10	%30
TNFRSF14	Nadir	%30
SOCS1	Nadir	%10-15
PTPN1	net değil	net değil
STAT6	Nadir	%5
CARD11	%10-15	%10-15
CD79B	%20-25	Nadir
MYD88	%35	Nadir
PRDM1	%15	Nadir
B2M	%15-20	%20-25
CD58	%10	%10

Yolaklarda düzensizlikler	ABC Tip	GCB Tip
NFkB aktivasyonu	Var	Yok
P13K/AKT	Yok	Var
JAK/STAT	Nadir	Var
İmmüniteden kaçış	Var	Var

2.13. Prognostik Özellikler

Diffüz büyük B hücreli lenfomada prognozu etkileyen klinik, immünohistopatolojik ve genetik faktörler mevcuttur. Hastaların yaklaşık %25-30'unda B semptomları olarak bilinen kilo kaybı, ateş, terleme belirtileri ortaya çıkmakta olup kötü prognozu işaret etmektedir. Ayrıca olguların yaşı, klinik evresi (Ann-Arbor), fiziksel performans durumu, tümör boyutu, ektranodal tutulum varlığı ve sayısı, kemik iliği tutulumu, eşlik eden ek hastalık varlığı, tam remisyona sağlanıncaya kadar alınan tedavi kür sayısı, nükse kadar geçen süre prognozda önemi olan diğer prognositik faktörlerdir. Biyokimyasal parametrelerden LDH, Beta-2 mikroglobulin, IL-2 reseptör, TNF-alfa, hemoglobin ve albümin, CRP düzeyi prognozu öngörmede yararlıdır. Prognozun öngörülebilmesi, olguda nüks ve tedaviye yanıt durumlarının tahmini, buna göre de tedavinin şekillendirilmesi ve gerekirse değiştirilmesi açısından çok büyük önem taşımaktadır. Diffüz büyük B hücreli lenfoma gibi agresif lenfomalarda kullanılabilecek, prognoz göstergesi kabul edilen, sayısal değerlerle ifade edilebilen skorlama sistemleri geliştirilmiştir. Bunlardan en çok tercih edilen IPI (International Prognostic Index) skorudur (25). Yaş, Ann-Arbor evresi (Tablo 2.3), performans durumu (Tablo 2.4), ektranodal tutulum sayısı ve serum LDH düzeyi olmak üzere beş parametre kullanılarak hesaplanır. 60 yaş ve üzeri olmak, ileri Ann-Arbor evresi (3-4), azalmış performans durumu (ECOG 2-4), 2 veya daha fazla ektranodal tutulum alanı, artmış serum LDH düzeyi kötü prognoz göstergeleri olup her biri '1' puan olarak skorlanır. Skorlar toplamı IPI skoru olarak adlandırılır. Bu değer '1' ise düşük risk, '2' ise düşük-orta risk, '3' ise yüksek-orta risk, '4-5' ise yüksek risk grubu olarak kabul edilir (Tablo 2.5). Yüksek risk grubunda beş yıllık sağkalım %26 civarında iken, düşük risk grubunda %73 civarında olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (68).

60 yaş ve altı hastalar için yaşa uyarlanmış IPI skoru (aa-IPI, age adjusted IPI) geliştirilerek, genç hastalarda prognoz öngörüsü daha tutarlı hale getirilmiştir (Tablo 2.6). Yaşa uyarlanmış IPI skorunda, Ann-Arbor evresi, performans durumu ve serum LDH düzeyi olmak üzere üç parametre kullanılmaktadır (68).

Tablo 2.3. Ann-Arbor Evrelemesi

EVRE	ÖZELLİKLER
1	Tek bir lenf düğümü bölgesi veya tek bir ektranodal organ tutulumu (1E)
2	Diyaframın bir tarafında 2 ya da daha fazla lenf düğümü bölgesi tutulumu, ektranodal organ ve bir ya da daha fazla lenf düğümü bölgesi tutulumu (2E)
3	Diyaframın her iki tarafında lenf düğümü bölgesi ve bunlara eşlik edebilen ektranodal organ (3E) ya da dalak (3S) ya da her ikisinin tutulumu (3SE)
4	Bir ya da daha fazla uzak ektranodal organın yaygın tutulumu

Tablo 2.4. ECOG Performans Durumu Sınıflaması

SKOR	TANIM
0	Kısıtlamasız normal aktivite
1	Ayakta gündelik işlerini yapıyor ancak ağır fiziksel aktiviteler sınırlı
2	Ayakta geçirmesi gereken sürenin %50'sinden azında yatağa bağımlı
3	Ayakta geçirmesi gereken sürenin %50'sinden fazlasında yataksandalyeye bağımlı
4	Yatağa bağımlı, yardımsız hiçbir işi yapamıyor

Tablo 2.5. Uluslararası Prognostik İndeks (IPI)

PROGNOSTİK FAKTÖRLER	
Yaş	>60
Ann-Arbor Evresi	İleri evre (Evre 3-4)
Performans durumu	ECOG 2-4
Ekstranodal tutulum	2 veya daha fazla sayıda
Serum LDH düzeyi	Artmış (>normal)

Tablo 2.6. Yaşa Uyarlanmış IPI (aa-IPI)- 60 Yaş ve Altı Hastalar İçin

PROGNOSTİK FAKTÖRLER	
Ann-Arbor Evresi	İleri evre (Evre 3-4)
Performans durumu	ECOG 2-4
Serum LDH düzeyi	Artmış (>normal)

Yaşa uyarlanmış IPI (aa-IPI) skorunda, her bir parametre ‘1’ puan kabul edilmekle birlikte, klasik skorlamadan farklı olarak ‘skor 0’ düşük risk, ‘skor 1’ düşük-orta risk, ‘skor 2’ yüksek-orta risk, ‘skor 3’ yüksek risk kabul edilmektedir.

Her ne kadar IPI skorlamasında ektranodal tutulum yerleri özellikle belirtilmese de prognozda sadece ektranodal tutulum sayısı değil, özel tutulum bölgeleri de farklılıklara yol açmaktadır (25, 69). Örnek olarak santral sinir sistemi tutulumu veya primer lenfomasının prognozu diğer ektranodal tutulum bölgelerinden çok daha kötüdür (70-73). IPI skorlaması bu riski öngörmede yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda IPI skorlamasını geliştirmeye ve ‘NCCN-IPI’ gibi özel ektranodal tutulum yerlerini de içeren daha kapsamlı prognoz tahminleri yapmaya yönelik çalışmalar mevcuttur (74-76). Bazı çalışmalarda bilinen klinik prognostik faktörlere ek olarak düşük absolü lenfosit sayısı, yükselmiş serum PD-L1 ve ürik asit seviyesi, abdominal lenf nodu tutulumu, vitamin D eksikliğinin de kötü prognozda rol oynadığı bildirilmiştir (25, 77-79).

Bu klinik prognostik parametrelerin yanısıra, moleküler subtipler, immüfenotipik ve genetik özelliklerin prognozda önemi büyüktür. Son yıllarda bu alanda bilgi birikimi artış göstermekte ve birçok yeni çalışma yapılmaktadır (39).

Morfolojik subtipler esas olarak en sık görülen üç tip olan sentroblastik, immünoblastik ve anaplastik varyanttır. Bazı çalışmalarda özellikle immunoblastik tipin kötü prognostik faktör olarak kullanılabilmesi belirtilse de çoğu çalışma morfolojik subtiplerin prognoz ile korelasyonunun zayıf olduğunu göstermektedir. Klinik faktörler ve diğer belirleyiciler olmadan morfolojik alt tiplerin tek başına prognostik faktör olarak kullanılmayacağını belirtmektedir (25).

Moleküler alt tiplerin ise prognozda önemi büyüktür. Olguların klinik ve immüfenotipik özellikleri farklılıklar yaratabilse de genel olarak beş yıllık sağkalım GCB tipte %70-80 olarak belirtilirken, ABC tipte %40-50’ ye düşmektedir (1).

BCL2 ekspresyonu özellikle aktive B hücreli tipte kötü prognostik faktördür. BCL2 ile birlikte MYC ekspresyonunun görülmesi ‘dual expressor DLBCL’ olarak adlandırılmakta olup kötü prognozda önemi büyüktür. Dual ekspresyon özellikle ABC tipte gözlenmektedir (%33-46). Ancak daha nadir de olsa GCB tipte görülmesinin (%17) prognozu çok daha kötü etkilediğini vurgulayan çalışmalar mevcuttur (1, 16, 25, 27, 48, 50, 80).

CD5 ve P53 ekspresyonunun da yine kötü prognozda etkili olduğu bilinmektedir (1, 16, 25). Bunlar dışında CD37 ekspresyon kaybı, HLA-DR ekspresyon kaybı ve FOXP1 ekspresyonu da kötü prognostik faktörler arasında sayılabilmektedir (25). Tümör mikroçevresi olarak bilinen, olguların içerdiği neoplastik olmayan hücreler ve ekstrasellüler matrisi de prognozda önemlidir. Ekstrasellüler matrisi ve histiyosit infiltrasyonu içeren mikroçevre 'stromal 1', yüksek damar dansitesi ve anjiogenez gözlenen tip 'stromal 2' olarak adlandırılır. 'Stromal 2' özellikle olguların daha kötü bir prognoza sahip oldukları düşünülmektedir (1).

BCL2, BCL6, MYC translokasyonları ve TP53 mutasyonları bilinen önemli kötü prognoz göstergeleridir. MYC ile birlikte BCL2 ve /veya BCL6 translokasyonları çok agresif bir klinik göstermekte olup, '2016 DSÖ' lenfoma sınıflamasında yüksek dereceli B hücreli lenfoma adı ile ayrı bir kategoride ele alınmış ve içerdiği translokasyon sayısına göre 'Double Hit' ve 'Triple Hit' olarak tanımlanmıştır (1, 25, 50, 81).

2.14. 2016 DSÖ Büyük B Hücreli Lenfomalar Sınıflamasında Yer Alan Özel Lenfoma Tipleri

2008 yılında yapılan ve 2016 yılında güncellenene kadar kullanılan DSÖ lenfoma sınıflamasında diffüz büyük B hücreli lenfoma, NOS kategorisinin özel tipleri olarak T lenfosit/histiyosit zengin büyük B hücreli lenfoma, santral sinir sisteminin primer diffüz büyük B hücreli lenfoması, primer kutanöz diffüz büyük B hücreli lenfoma, 'leg type', yaşlıların EBV pozitif diffüz büyük B hücreli lenfoması listede alt kategoride yer almaktaydı. Ancak 2016 yılında güncellenen DSÖ lenfoma sınıflamasında bu antiteler diffüz büyük B hücreli lenfoma, NOS' un alt kategorisi olarak değil ayrı birer antite olarak yer almaktadırlar. 2008 DSÖ sınıflamasında yer almayan GCB ve ABC tip moleküler alt gruplar ise yeni 2016 DSÖ sınıflamasında DLBCL, NOS kategorisinin iki alt grubu olarak listeye dahil edilmiştir. Ayrıca 2008 DSÖ lenfoma sınıflamasında 'B hücreli lenfoma, sınıflandırılmayan, diffüz büyük B hücreli lenfoma ve Burkitt lenfoma arasında özellikler içeren' adıyla ayrı bir antite olarak bilinen kategori, 2016 DSÖ lenfoma sınıflamasında 'Yüksek dereceli B hücreli lenfoma' adıyla yeni bir kategori olarak yer bulmuştur. Yüksek dereceli B

hücreli lenfomanın kapsadığı vaka aralığı ve niteliği de ‘2.15. Bölüm’ de anlatıldığı gibi genişletilmiştir. 2016 DSÖ sınıflamasında yer alan DLBCL, NOS dışındaki diğer antiteler Tablo 2.7 ‘de gösterilmiştir.

Tablo 2.7. Diğer Büyük B hücreli Lenfomalar, DSÖ 2016

YÜKSEK DERECELİ B HÜCRELİ LENFOMA
Yüksek Dereceli B Hücreli Lenfoma, MYC ve BCL2 ve/veya BCL translokasyonu içeren
Yüksek Dereceli B hücreli Lenfoma, daha ileri spesifikite edilemeyen (NOS)
DİĞER BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMALAR
T lenfosit/histiyosit zengin büyük B hücreli lenfoma
Santral sinir sisteminin primer diffüz büyük B hücreli Lenfoması
Primer kutanöz diffüz büyük B hücreli lenfoma, ‘leg type’
EBV pozitif diffüz büyük B hücreli lenfoma, NOS
Kronik inflamasyon ilişkili diffüz büyük B hücreli lenfoma
Lenfomatoid granulomatozis
IRF4 yeniden düzenlenimi içeren büyük B hücreli lenfoma
Primer mediastinal (timik) büyük B hücreli lenfoma
İntravasküler büyük B hücreli lenfoma
ALK pozitif büyük B hücreli lenfoma
Plazmablastik lenfoma
HHV8 pozitif diffüz büyük B hücreli lenfoma
Primer efüzyon lenfoması
B HÜCRELİ LENFOMA, SINIFLANDIRILAMAYAN
B hücreli lenfoma, Klasik Hodgkin lenfoma ile DLBCL arasında özellikler içeren

2.15. Yüksek Dereceli B Hücreli Lenfoma (HGBL)

Yüksek dereceli B hücreli lenfoma (HGBL) matür B lenfositlerden köken alan, biyolojik ve klinik olarak diffüz büyük B hücreli lenfoma, NOS veya Burkitt lenfoma olarak sınıflandırılmayan prognozu kötü seyreden lenfomalardır. Bu terim ilk defa 2016 DSÖ lenfoma sınıflamasında yer almış olup, daha önceki 2008 DSÖ

sınıflamasında diffüz büyük B hücreli lenfoma, NOS veya Burkitt lenfoma arasında özellikler içeren, sınıflandırılmayan grubu temsil etmektedir (1, 3). Ancak kapsadığı vaka grubunun biraz daha kapsamlı olduğu söylenebilir. Yüksek dereceli B hücreli lenfoma iki alt grupta ele alınmaktadır (81).

İlk kategori MYC translokasyonu ve BCL2 ve/veya BCL6 translokasyonu içeren ‘Double Hit’ ve ‘Triple Hit’ olarak adlandırılan gruptur. Bu kategorideki olgular bir tanesi MYC olmak koşuluyla iki veya üç translokasyonu aynı anda içeren olgulardır ve translokasyon sayısına göre isimlendirilir. Bu kategori morfolojik olarak üç şekilde izlenebilir. Bunlardan ilki olgular DLBCL, NOS morfolojisinde olup, MYC translokasyonu ve BCL2 ve/veya BCL6 translokasyonu içermektedirler. İkinci olarak DLBCL, NOS ile Burkitt lenfoma arasında morfolojik özellikler içeren, sınıflandırılmayan olgular yine bu gruba dahil edilir (82-86). Üçüncü olarak blastoid morfolojide MYC translokasyonu ve BCL2 ve/veya BCL6 translokasyonu içerebilmektedirler. Özellikle blastoid morfolojide olan olgular çok nadir görülmekte olup, prekürsör lezyonları ekarte etmek için TDT ve blastoid varyant mantle hücreli lenfomayı ekarte etmek için Siklin D1 immünohistokimyasal belirleyicileri uygulanmalıdır (1, 84).

Olguların yaklaşık yarısının DLBCL, NOS morfolojisinde olduğu bildirilmektedir. Büyüme paterni diffüzdür. Bazı olgularda fibrozis ve makrofajlar gözlenebilmektedir. Mitoz ve proliferasyon indeksi değişkendir. Nükleus boyutu da aynı şekilde değişken olmakla birlikte Burkitt lenfoma hücrelerinden daha büyük ve daha az bazofilik oldukları belirtilmektedir (1, 84).

Olguların yarısına yakın bir kısmı da morfolojik olarak DLBCL, NOS ile Burkitt lenfoma arasında özellikler içermekte olup, orta-iri nükleusa sahip ya da monomorfik orta boyutlu tamamen Burkitt lenfoma hücrelerine benzeyebilmektedir. Her ne kadar morfoloji Burkitt lenfomayı andırsa da immünprofil desteklemediği için bu olgularda Burkitt lenfoma tanıda dışlanmaktadır. Bu aşamada özellikle güçlü ve diffüz BCL2 ekspresyonu Burkitt lenfomayı ekarte etmekte kullanılabilir (1, 84, 86).

İmmünohistokimyasal olarak CD19, CD20, CD79a ve PAX5 eksprese ederler. Çoğu olguda CD10 ve BCL6 pozitifdir, MUM1 ekspresyonu sadece %20 civarı vakada görülebilmektedir. Güçlü sitoplazmik BCL2 pozitifliği de özellikle

BCL2 ve MYC translokasyonu içeren ‘Double hit’ lenfomalarda önemlidir. ‘Double Hit’ lenfomalar sıklıkla BCL2 ve CMYC eksprese ederler, yani sıklıkla ‘double ekspresör’ özelliktedir. Bu olguların germinal merkez B hücre kökenli olduğu bilinmektedir. Ancak daha nadir görülmekle birlikte BCL6 ve MYC translokasyonu içeren ‘Double hit’ lenfomalarda immünprofil tamamen farklı olabilmektedir. BCL2 ve CD10 ekspresyonu zayıf veya değişken, MUM1 ekspresyonu da tam tersine daha yaygın gözlenebilmektedir. Ki-67 proliferasyon indeksi genellikle %70 üzerinde izlenmekte olup, nadiren daha düşük seviyelerde de olabileceği bildirilmiştir. Özellikle Burkitt lenfoma morfolojisinde olan olguların daha yüksek, DLBCL, NOS morfolojisindeki olguların daha düşük proliferasyon indeksine sahip olduğunu söyleyen yayınlar da mevcuttur. Ek olarak tanı için de şart olan BCL2, BCL6, MYC translokasyonların yanı sıra yine BCL2, BCL6 ve MYC kopya sayısı değişiklikleri ve amplifikasyonları da sıklıkla izlenebilmektedir. BCL2, BCL6, MYC translokasyonlarının üçünü de içeren olgular ‘Triple hit’ olarak adlandırılmaktadır. Daha nadir görülen bir kategoridir (1, 84-87).

İkinci yüksek dereceli B hücreli lenfoma kategorisi, ‘HGBL, NOS’ olarak tanımlanan translokasyon içermeyen ya da sadece tek translokasyonu bulunan ancak morfolojik olarak DLBCL, NOS kategorisine alamadığımız olguları içermektedir. Bu olgular morfolojik olarak Burkitt lenfoma benzeri olup immünfenotipik olarak Burkitt tanısı konulamayanlar ile Burkitt ve DLBCL, NOS arası morfolojiye sahip olup sınıflandırılmayanlar olarak ifade edilebilir. Ancak klasik DLBCL, NOS morfolojisine uyan olgular kesinlikle bu kategoriye alınmamalıdır (84).

Yüksek dereceli B hücreli lenfoma olguları genellikle daha yaşlı hasta grubudur, 6. ve 7. dekatta sık görülür. Yarısından fazlasında yaygın organ ve lenf nodu tutulumu gözlenmektedir. Çoğu olguda birden fazla ektranodal bölge (%30-88), kemik iliği (%59-94) ve santral sinir sistemi tutulumu (%45) gözlenir. IPI skoru yüksek beklenmekte olup standart tedaviye yanıt kötüdür, erken nüks sıktır (1, 86). Sağkalım oldukça düşüktür, ortalama 5 ay -2 yıl arasında beklenmektedir (88).

2.16. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma, NOS Tedavisi

Diffüz büyük B hücreli lenfomada standart tedavi ‘rituksimab, siklofosfomid, doksorubisin, vinkristin ve prednizon’ kombinasyonundan oluşmakta, ‘R-CHOP’

olarak adlandırılmaktadır. Bu tedavi ile yaklaşık %60-70 DLBCL olgusunda tam yanıt alınabilmektedir. Ancak %30-40 olguda nüks veya tedavi direnci gözlenmektedir. Otolog kök hücre nakli özellikle genç hastalarda tedavi seçeneğidir. R-CHOP tedavisinden iyi sonuç alınamayan veya yüksek riskli kategoride olup klasik tedaviye iyi sonuç alınamayacağı düşünülen olgularda 'R-EPOCH' olarak adlandırılan tedavi protokolü kullanılabilmektedir. R-EPOCH protokolü yüksek doz rituksimab, etoposid, prednizon, vinkristin, siklofosfomid ve doksorubisin içermektedir (16, 71, 89).

DLBCL olgularının moleküler alt tiplerini ve içerdiği genetik değişiklikleri bilmek, tedaviyi planlama açısından çok önemlidir. Bunlara yönelik yeni tedavi ajanları keşfedilmiş ve araştırılmaya da devam edilmektedir. Örnek olarak ABC/Non-GCB tip DLBCL olgularında bir bruton tirozin kinaz inhibitörü olan İbrutinib, R-CHOP tedavisi ile birlikte kullanılarak prognozda iyileşme sağlanmaktadır (90-92). Ayrıca CD30 pozitifliği olan olgularda brentuksimab vedotin, PDL1 genetik değişiklikleri olan olgularda nivolumab, atezolizumab, NFkB yolağında mutasyon durumunda bortezomib, EZH2 mutasyonlu olgularda GSK-126, standart tedaviye iyi yanıt alınmadığı durumlarda CD19 hedefe yönelik tedavi seçeneği olan CART-1 kullanımı önerilmektedir (16, 43, 45, 78).

2.17. Ayırıcı Tanı

Daha önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi Diffüz büyük B hücreli lenfoma, NOS ayırıcı tanısında yüksek dereceli B hücreli lenfoma (HGBL), Burkitt lenfoma ile T lenfosit/histiyositten zengin büyük B hücreli lenfoma, santral sinir sisteminin primer diffüz büyük B hücreli lenfoması, primer kutanöz diffüz büyük B hücreli lenfoma, 'leg type', yaşlıların EBV pozitif diffüz büyük B hücreli lenfoması, primer mediastinal büyük B hücreli lenfoma gibi özel büyük B hücreli lenfoma tipleri yer almaktadır. Ayrıca yüksek dereceli folliküler lenfoma, blastoid mantle hücreli lenfoma ve B lenfoblastik lösemi/lenfoma da B hücre kökenli neoplazmlar arasında DLBCL, NOS ile ayırıcı tanıda ele alınması gereken antitelendir (1).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olguların Seçimi

Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul'u tarafından onaylanmıştır (Tarih: 24/12/2018, No:26). Bu çalışmaya, ESOGÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2018-2020 yılları arasında diffüz büyük B hücreli lenfoma tanısı almış ve parafin bloklarında çalışma için yeterli doku bulunan 54 olgu dahil edilmiştir. Olguların patoloji preparatları arşivden çıkarılarak morfolojik tip ve hücre boyutu açısından tekrar değerlendirilmiştir. Mevcut patoloji raporlarından yaş, lokalizasyon, nodal-ekstranodal tutulum durumu bilgilerine ulaşılmıştır. Bunlar arasında FISH ile genetik çalışma sonuçları da analiz edildikten sonra, 45 olgu DLBCL, NOS kategorisi ile uyumlu bulunmuştur. Diğer 9 olgunun 3'ü yüksek dereceli B hücreli lenfoma, 4'ü santral sinir sisteminin primer diffüz büyük B hücreli lenfoması, 1'i primer mediastinal büyük B hücreli lenfoma, 1'i primer kutanöz diffüz büyük B hücreli lenfoma, "leg type" olgularıdır. İmmünohistokimyasal çalışma ve FISH analizi istatistiksel değerlendirmeleri DLBCL, NOS kategorisindeki 45 olgu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Olgulara ait klinik, radyolojik ve laboratuvar bulguları araştırılmış, 36 olgunun klinik takibine ulaşılarak bilgileri çalışmaya dahil edilmiştir. 9 DLBCL, NOS olgusunun ise klinik takibi ve verileri bulunmamaktadır.

3.2. Histopatolojik İnceleme

Olguların H&E kesitleri arşivden çıkarılarak morfolojik tip açısından tekrar değerlendirilmiştir. Olgular bilinen üç klasik morfolojik tip olan sentroblastik, immünoblastik, anaplastik tiplere kategorize edilmiştir. Sentroblastik tip, %90 üzeri sentroblast içerme durumuna göre monomorfik ve polimorfik olarak alt kategorilere ayrılmıştır. Üç klasik tipe de uymayan durumlarda, olgular sınıflandırılmayan olarak kategorize edilmiştir.

3.3. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Çalışmaya dahil edilen 45 olgunun hematoksilen eozin kesitleri tekrar incelenmiştir. Tümörü en iyi temsil eden parafin bloklar seçilmiştir. Bu bloklardan 4 mikron kalınlığında kesitler hazırlanmıştır. Parafin kesitler 60 °C etüvde 1 saat inkübe edilmiştir. Doku kesitlerine, DAKO Omnis otomatik immünohistokimyasal boyama cihazı (DAKO Omnis Denmark) kullanılarak, BCL2 (Ventana Medical Systems Inc. , SP66 klonu, Rabbit monoklonal antikoru)(uygulamaya hazır formda) immünohistokimyasal belirleyicisi dilüe edilmeksizin uygulanmıştır. Kesitler distile sudan geçirilerek %96'lık alkolden 2 kez, %99'luk alkolden 1 kez ve ksilden 3 kez geçirilmiştir. Ksilen bazlı lam kapatıcı ile kapatılarak preparatlar değerlendirilmeye hazır hale getirilmiştir.

Olgulara daha önce, ilk tanı verilirken uygulanmış olan immünohistokimyasal belirleyicilerin preparatları arşivden çıkarılarak tekrar değerlendirilmiştir. Bölümümüzde daha önce, ilk tanı anında yapılan bu immünohistokimyasal belirleyiciler; kullanıma hazır CD10 (DAKO Envision Flex, 56C6 klonu, Monoclonal Mouse Anti-human), BCL6 (DAKO Envision Flex, PG-B6p klonu, Monoclonal Mouse Anti-human), MUM1 (DAKO Envision Flex, MUM1p klonu, Monoclonal Mouse Anti-human), CD30 (DAKO Envision Flex, Ber-H2 klonu, Monoclonal Mouse Anti-human), EBV LMP (DAKO Envision Flex, CS.1-4 klonu, Monoclonal Mouse Anti-Epstein-Barr Virus), BCL2 (DAKO Envision Flex, 124 klonu, Monoclonal Mouse Anti-human BCL2 oncoprotein), Ki-67 (DAKO Envision Flex, MIB-1 klonu, Monoclonal Mouse Anti-human) antikorlarıdır. Ayrıca C-MYC (Epitomics, EP121 klonu, Rabbit Monoclonal Antikoru) da yine daha önce tanı anında uygulanmış immün belirleyicilerden olup değerlendirmeye dahil edilmiştir.

3.4. İmmünohistokimyasal Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

BCL2 SP66 immünohistokimyasal belirleyici analizinde kontrol olarak reaksiyoner lenf nodu kullanılmıştır. Neoplastik hücrelerde %50 ve üzerinde sitoplazmik boyanma pozitif kabul edilmiştir.

Daha önce tanı aşamasında uygulanmış, arşivden preparatlarına ulaşılarak değerlendirilmiş immün belirleyicilerden CD10 ile neoplastik hücrelerde %30 ve üzerinde membranöz boyanma pozitif kabul edilmiştir. BCL6 ve MUM1 ile %30 ve

üzerinde nükleer boyanma pozitif kabul edilmiştir. CD30 ile membranöz ve ‘dot like’ sitoplazmik paternde boyanma beklenmekte olup her olguda boyanma yüzdesi belirtilmiştir. İstatiksel analizde pozitiflik için eşik değer %10 boyanma olarak kabul edilmiştir. BCL2 clone124 ile %50 ve üzerinde sitoplazmik boyanma, CMYC ile %40 ve üzerinde nükleer boyanma pozitif kabul edilmiştir. EBV LMP1 ile membranöz ve perinükleer ‘dot like’ boyanma değerlendirilmiştir. Ki-67 ile neoplastik hücrelerde nükleer boyanma yüzdesi, proliferasyon indeksi olarak belirtilmiştir. Olgular Hans algoritmasına göre, CD10, BCL6, MUM1 belirleyici sonuçları ile GCB ve Non-GCB moleküler alt tiplere ayrılmıştır.

3.5. FISH Yöntemi

Çalışma için taranan 54 olgunun 33’ünde daha önce tanı verilirken, FISH ile BCL2, BCL6, MYC translokasyon/yeniden düzenlenmesi çalışılmış olup Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafından mevcut sonuçları taranmıştır. Geriye kalan olgulardan parafin bloklarında yeterli doku mevcut olan 21 tanesinden Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı’nda uygun kesitler alınarak deparafinize edilip, BCL2, BCL6 ve MYC translokasyon/yeniden düzenlenmesi çalışılmak üzere Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’na gönderilmiş ve sonuçları analiz edilmiştir. BCL2, BCL6 ve MYC translokasyon sonuçlarına göre 45 olgu DLBCL, NOS kategorisi ile uyumlu olup çalışmaya dahil edilmiştir.

FISH tekniğinde Rieder ve arkadaşları (93) tarafından geliştirilen protokol modifiye edilerek uygulanmıştır. Çalışma için kullanılan proplar; BCL2 (The ZytoLight® SPEC BCL2 Dual Color Break Apart Probe), BCL6 (The ZytoLight® SPEC BCL6 Dual Color Break Apart Probe), MYC (The ZytoLight® SPEC MYC Dual Color Break Apart Probe) direkt florokrom işaretli Break Apart proplarındır.

3.5.1. Preparatların Ön Yıkaması

Preparatlar sırasıyla 2XSSC solüsyonundan ve %70, %85, %100’lük alkol serisinden ikişer dakika bekletilmek üzere geçirilerek dehidre edilmiştir.

3.5.2. Denatürasyon ve Hibridizasyon

Probun bulunduğu 1ml’lik tüpler santrifüj edilerek tüm probun dibine çökmesi sağlanmıştır. Ön yıkaması biten preparatlarda belirlenen alana prob (5 µl)

eklenmiş ve 24 mm'lik lamel kapatılmıştır. HyChrome (Glia medikal) hibridizasyon cihazında 75°C'de, 10 dakika denatürasyon yapılmıştır. İşlem bittikten sonra preparatlar nemli ortamda 18 saat hibridizasyona bırakılmıştır.

3.5.3. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar

Hibridizasyonu tamamladıktan sonra preparatlar alınarak üstündeki lamelleri 2XSSC'de çıkartılmış, 0.4XSSC solüsyonu içerisinde 72°C'de 2 dakika bekletilmişlerdir. Daha sonra 2XSSC/T-20 solüsyonunda 45 saniye bırakılmıştır.

3.5.4. Hibridize Olan Bölgelerin Görünür Kılınması

Hibridizasyon sonrası yıkamaları yapılan preparatlar 4XSSC/DAPI solüsyonunda 2 dakika bekletilmiş, süre sonunda 20 µl yüzey boyası (Vectashield) damlatılıp lamel kapatılmıştır. İnceleme aşamasına kadar preparatlar -20°C'de ve karanlıkta bekletilmişlerdir.

3.5.5. İşlemler Sırasında Kullanılan Solüsyonlar

Tablo 3.1. Carnoy's fiksatif solüsyonları

Metanol	3 birim
Asetik Asit	1 birim

Tablo 3.2. Ön Yıkama Solüsyonları

20XSSC solüsyonu	NaCl (3M)	175,3gr
	Trisodyum Sitrat	88,24gr
	Distile su	1000 ml
2XSSC solüsyonu	20XSSC	20ml
	Distile su	180ml

Tablo 3.3. Hibridizasyon Sonrası Kullanılan Solüsyonlar

0.4XSSC	20XSSC	20 ml
	Distile su	180 ml
2XSSC	20XSSC	4 ml
	Distile su	196 ml
2XSSC/Tween-20 Solüsyonu	20XSSC	20 ml
	Distile su	180 ml
	Tween 20	100 µl

Tablo 3.4. Görüntüleme Sistemi Solüsyonu

DAPI/Antifade Solüsyonu	2XSSC	20 ml
	DAPI	100 µl
	Distile su	80 ml

3.5.6. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi

Preparatlar Olympus BX-61 Floresan mikroskobunda 100'lük büyütmede uygun filtrelerle incelenmiştir. Floresan mikroskoba bağlı soğutmalı kamera ve görüntü analiz sistemi aracılığıyla her olguya ilişkin FISH analiz verileri incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.6. FISH Değerlendirmesi

Preparatlarda neoplastik hücrelerin olduğu belirlenen bölgelerde 100 hücre, 100'lük büyütmede floresan mikroskopta analiz edilmiştir. Kullanılan proplar neoplastik ve neoplastik olmayan alanlarda analiz edilip, ilgili istatistiksel hesaplama sonrası sabit değer %7-10 olacak şekilde belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucu %10'un üstünde bulunan her farklı sinyal paterni anomali olarak değerlendirilmiştir.

Değerlendirme esnasında her bir gen bölgesi için sinyal sayısı; 2'den az ise delesyon, 3 ve daha fazla polizomi olarak kabul edilmiştir. BCL2, BCL6, MYC proplarını için aynı işlemler ayrı ayrı tekrarlanmış, sonuçları analiz edilmiştir.

BCL2, BCL6, MYC lokuslarında translokasyon/yeniden düzenlenme, monozomi ve polizomi varlığı araştırılmıştır. Olguların klinik, histopatolojik ve

immünofenotipik özellikleri ile FISH sonuçları arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.7. Klinik Veriler, Evre ve IPI skorlaması

45 olgunun 9 tanesinin hastanemizde klinik takibi bulunmamaktadır. Geriye kalan 36 olgunun PET/CT, anamnez, fizik muayene ve laboratuvar bilgilerine ulaşılmıştır. Hastaların tanı anındaki PET/CT raporlarından Ann-Arbor evresi belirlenmiştir. Anamnez, fizik muayene ve laboratuvar bilgileri de değerlendirilerek IPI (International Prognostic Index) skoru hesaplanmıştır. 60 yaş üzeri hastalarda IPI skoru; yaş, Ann-Arbor evresi (Tablo 2.3), performans durumu (Tablo 2.4), ektranodal tutulum sayısı ve serum LDH düzeyi olmak üzere beş parametre kullanılarak hesaplanmıştır. 60 yaş ve üzeri olmak, ileri Ann-Arbor evresi (3-4), azalmış performans durumu (ECOG 2-4), 2 veya daha fazla ektranodal tutulum alanı, artmış serum LDH düzeyinden her biri '1' puan olarak skorlanmıştır. Skorlar toplamı '1' ise düşük risk, '2' ise düşük-orta risk, '3' ise yüksek-orta risk, '4-5' ise yüksek risk grubu olarak kabul edilmiştir (Tablo 2.5).

60 yaş ve altı hastalar için yaşa uyarlanmış IPI skoru (aa-IPI, age adjusted IPI) kullanılmış, Ann-Arbor evresi, performans durumu ve serum LDH düzeyi olmak üzere üç parametre değerlendirilmiştir (Tablo 2.6). İleri Ann-Arbor evresi (3-4), azalmış performans durumu (ECOG 2-4), artmış serum LDH düzeyinden her bir parametre '1' puan kabul edilip toplanmış, klasik skorlamadan farklı olarak 'skor 0' düşük risk, 'skor 1' düşük-orta risk, 'skor 2' yüksek-orta risk, 'skor 3' yüksek risk kabul edilmiştir. Tüm olgularda prognostik gösterge olarak kullanılacak IPI skoru düşük, düşük-orta, yüksek-orta ve yüksek risk grupları olarak dört grupta kategorize edilmiştir.

3.8. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinin uygulanmasında IBM Statistics 21.0 programından yararlanılmıştır. Kategorik veriler yüzde (%) olarak belirtilmiştir. Çapraz tabloların analizinde "Pearson chi-square" ve "Fisher's exact" testleri kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık için " $p < 0,05$ " değeri kriter olarak kabul edilmiştir.

Tablo 3.5. Klinik, histopatolojik ve moleküler parametrelerin değerlendirilmesi

Yaş	60 yaş altı 60 yaş üstü
Grup	Nodal Sekonder ektranodal Primer ektranodal Ektranodal, takipsiz
Organ	Nodal Adrenal Cilt Dalak Duodenum Karaciğer Kemik iliği Kolon Mediasten Mide Periton Serviks Santral sinir sistemi Testis Tonsil
IPI skoru	Düşük risk Düşük-orta risk Yüksek-orta risk Yüksek risk
Ann-Arbor Evre	Evre 1 Evre 2 Evre 3 Evre 4

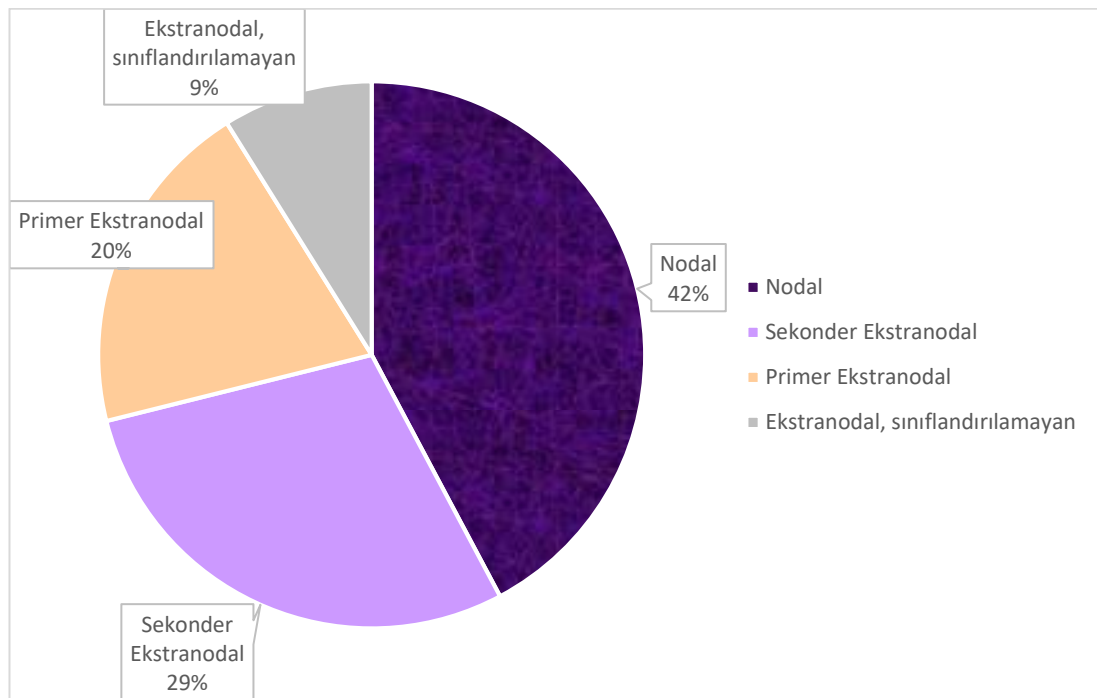
LDH düzeyi	Düşük (<215) Yüksek (>215)
Morfolojik tip	Sentroblastik, monomorfik Sentroblastik, polimorfik İmmunoblastik Anaplastik Nadir görülen tip Sınıflandırılmayan
Moleküler alt tip	Germinal merkez B hücreli tip (GCB) Aktive B hücreli tip (ABC)
CD10	Pozitif (>%30) Negatif (<%30)
BCL6	Pozitif (>%30) Negatif (<%30)
MUM1	Pozitif (>%30) Negatif (<%30)
BCL2, clone 124	Pozitif (>%50) Negatif (<%50)
BCL2, SP66	Pozitif (>%50) Negatif (<%50)
C-MYC protein	Pozitif (>%40) Negatif (<%40)
Ki-67 proliferasyon indeksi	%40-49 %50-79 %80-100
CD30	Ekspresyon yüzdesi %1 eşik değerine göre pozitiflik %10 eşik değerine göre pozitiflik
EBV LMP1	Pozitif Negatif

FISH BCL2 analizi	Normal Translokasyon/Yeniden düzenlenme Monozomi Trizomi Polizomi
FISH BCL6 analizi	Normal Translokasyon/Yeniden düzenlenme Monozomi Trizomi Polizomi
FISH MYC analizi	Normal Translokasyon/Yeniden düzenlenme Monozomi Trizomi Polizomi

4. BULGULAR

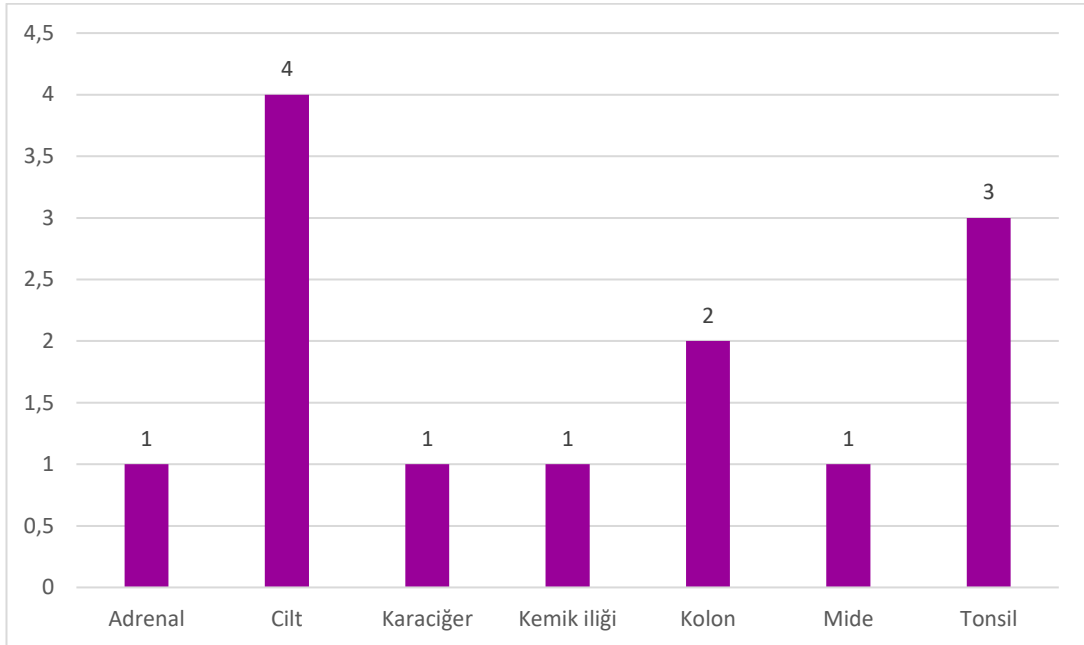
4.1. Klinik, Morfolojik, İmmünohistokimyasal ve Moleküler Bulguların Dağılımları

Çalışmaya dahil edilen 45 DLBCL, NOS olgusunun yaşları 19-82 yaşları arasında değişmektedir. Yaş ortalaması 59,2' dir. Olguların 23 (%51,1)'ü 60 yaşın altında, 22 (%48,9)'si 60 yaş ve üzeridir. 17 (%37,8) olgu kadın, 28 (%62,2) olgu erkek cinsiyettedir. 19 (%42,2) olgu nodal, 13 (%28,9) olgu sekonder ektranodal, 9 (%20) olgu primer ektranodal kategoridedir. Geri kalan 4 olgu ektranodal lokalizasyonda tanı almış olup, hastanemizde klinik ve radyolojik takipleri olmadığından primer ektranodal-sekonder ektranodal ayrımı yapılamamıştır (Şekil 4.1).



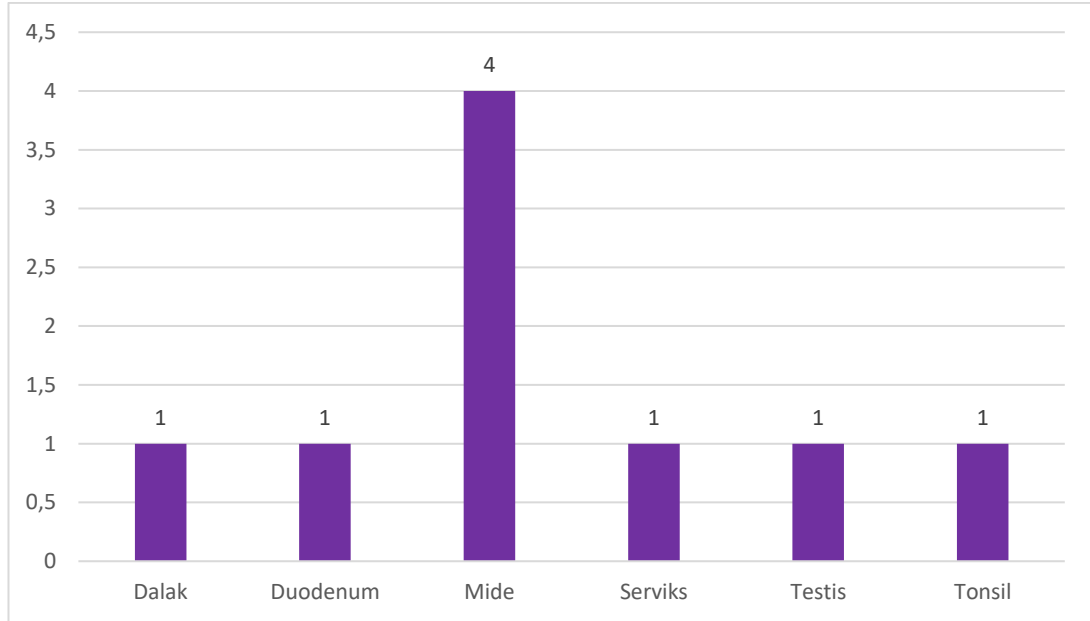
Şekil 4.1. DLBCL, NOS olgularının dağılımı

Olguların organ dağılımlarına bakıldığında; 19 (%42,2) olgu nodal lokalizasyonludur. Sekonder ektranodal olguların 4'ü cilt, 3'ü tonsil, 2'si kolon, 1'i mide, 1'i adrenal, 1'i karaciğer, 1'i kemik iliği lokalizasyonludur (Şekil 4.2).



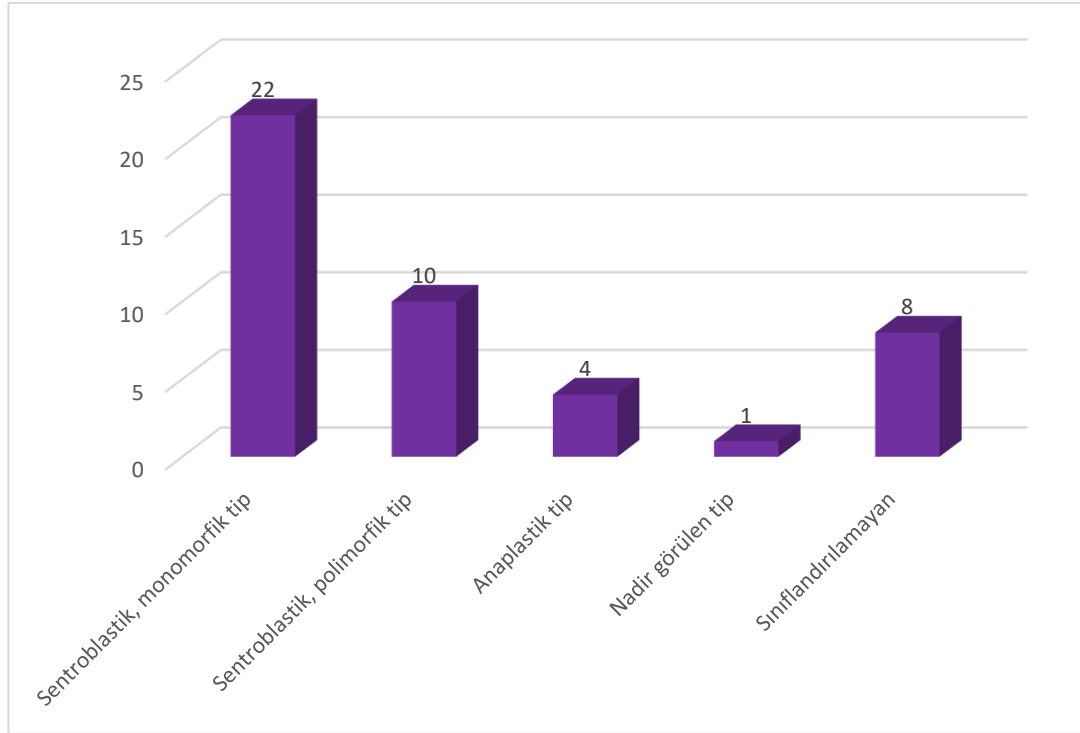
Şekil 4.2. Sekonder ektranodal tutulum bölgeleri

Primer ektranodal olguların 4'ü mide lokalizasyonlu olup, dalak, duodenum, serviks, testis ve tonsil lokalizasyonlu birer olgu mevcuttur (Şekil 4.3). Geri kalan takipsiz 4 ektranodal olgunun, 2'si mide, 1'i tonsil, 1'i periton lokalizasyonludur.



Şekil 4.3. Primer ektranodal organ dağılımı

Olgularda morfolojik tiplerden en sık görülen sentroblastik/monomorfik tip olup, 22 (%48,9) olgu bu morfolojidedir. 10 (%22,2) olgu sentroblastik/polimorfik, 4 (%8,9) olgu anaplastik tiptedir. 9 olgu üç klasik morfolojik tipe uyumlu bulunmayıp, bunlardan 1'i nadir görülen varyantlardan olan iğsi hücreli tiptedir. Geri kalan olguların 2'si sentroblastik-immünoblastik arasında iri ve hibrid morfolojiye sahip, 1'i berrak hücreli, 2'si plazmositoid görünümündedir. Olgulardan 3'ü tespit bozukluğu nedeniyle kesin olarak tiplendirilememiştir (Şekil 4.4). Çalışmamızda immünoblastik tipe olgu gözlenmemiştir. Olgulardan 2'si foliküler lenfomadan, 1'i nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfomadan transformasyon sonucu gelişmiştir.



Şekil 4.4. DLBCL, NOS olgularının morfolojik tiplere göre dağılımı

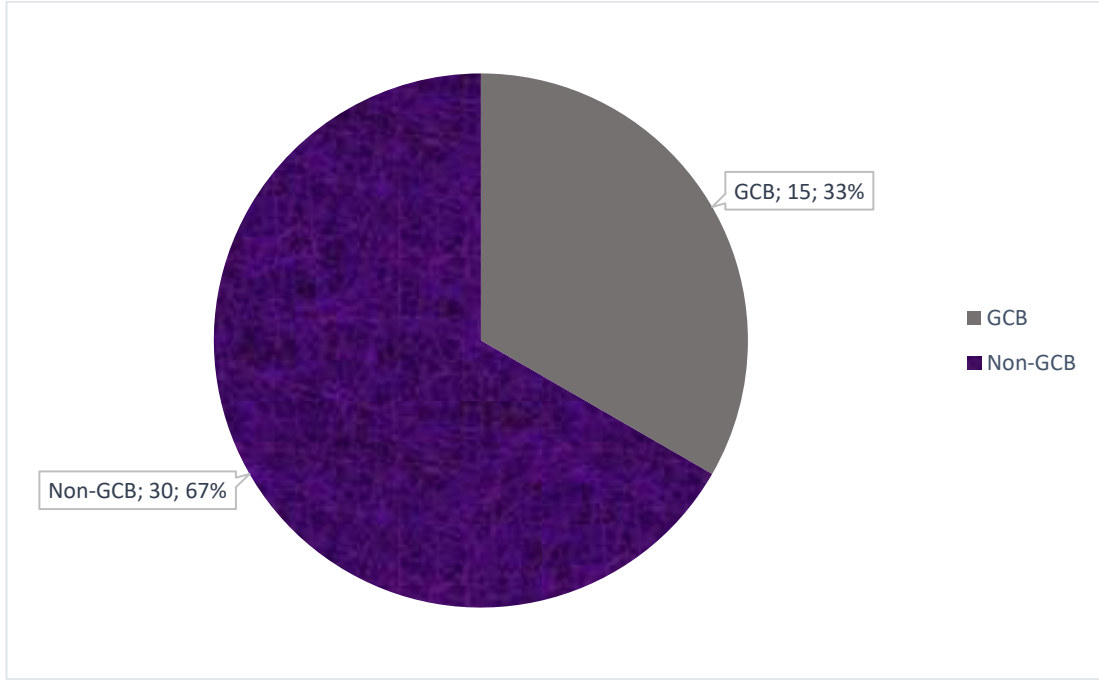
İmmünohistokimyasal değerlendirme

Olgulara ilk tanı aşamasında uygulanan immünohistokimyasal belirleyicilerin değerlendirilmesinde; CD10, BCL6, MUM1 pozitiflik için eşik değer %30 kabul edilmiştir. Bu değerlere göre pozitiflik sayı ve oranları “Tablo 4.1” de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. İmmünohistokimyasal belirleyicilerin ekspresyon oranları

CD10	Pozitif	9 (%20)
	Negatif	36 (%80)
BCL6	Pozitif	39 (%86,7)
	Negatif	6 (%13,3)
MUM1	Pozitif	32 (%71,1)
	Negatif	13 (%28,9)

Bu bulgularla, Hans algoritmasına göre moleküler alt tip belirlenmiştir. Olguların 15 (%33,3)'i germinal merkez B hücreli (GCB) tip, 30 (%66,7)'u germinal merkez hücreli dışı (Non-GCB/ ABC) tiptedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. DLBCL, NOS olgularının moleküler alt tiplere göre dağılımı

Çalışmamızda BCL2, BCL6 ve CMYC protein ekspresyonları değerlendirildi. BCL2 immünohistokimyasal belirleyicisinin ekspresyonu için eşik değer %50 kabul edilmiştir. BCL2 ekspresyonu "Clone 124" ve "SP66" klonları ile değerlendirildi. "SP66" klonu ile 34 olguda pozitiflik gözlenirken, "Clone 124" ile 32 olguda pozitiflik mevcuttur (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. DLBCL, NOS olgularında BCL2 ekspresyonu

BCL2, clone 124	Pozitif	32 (%71,1)
	Negatif	13 (%28,9)
BCL2, SP66	Pozitif	34 (%75,6)
	Negatif	11 (%24,4)

BCL6 ekspresyonu 39 (%86,7) olguda pozitifdir (Tablo 4.1). BCL6 pozitif olan olguların 14 (%35,9)'ü GCB, 25 (%64,1)'i ABC tiptedir.

CMYC protein ekspresyonunu pozitif kabul etmek için eşik değer %40 olarak kabul edilmiştir. Olgulardan 21 (%46,7)'sinde CMYC ekspresyonu mevcuttur (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. DLBCL, NOS olgularında CMYC protein ekspresyonu

CMYC	Pozitif	21 (%46,7)
	Negatif	24 (%53,3)

Hedefe yönelik tedavi seçeneğinin mevcut olması ve prognozla ilişkisi açısından CD30 immünohistokimyasal belirleyicisi ile olgular değerlendirildi. Olgulardan 11'inde CD30 pozitif izlenmiş olup, boyanma yüzdesi %1-%70 arasında değişmektedir. Olguların 34'ü CD30 negatiftir. CD30 ile boyanmada, pozitif kabul etmek için literatürde kesin bir eşik değeri bulunmamaktadır. Bazı çalışmalarda da kullanıldığı gibi %1 ve %10 eşik değerlerine göre pozitiflik durumu belirlenmiş olup, çalışmamızda ayrı ayrı istatistiksel analizde kullanılmıştır. Çalışmamızda, 45 olguda %1 eşik değerine göre 11 (%24,4), %10 eşik değerine göre 8 (%17,7) olgu pozitifdir (Tablo 4.4). CD30 pozitif 11 olgunun 9'u ABC tip, 2'si GCB tiptedir.

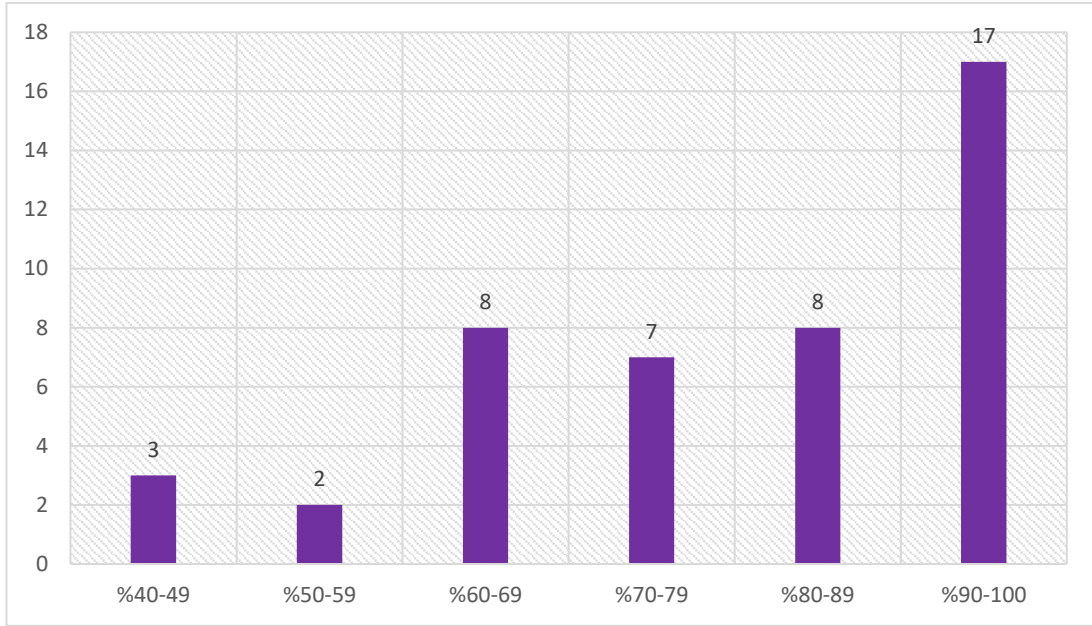
Tablo 4.4. CD30 ile %1 ve %10 eşik değerlerine göre pozitiflik oranları

CD30 (%1 eşik değer)	Pozitif	11 (%24,4)
	Negatif	34 (%75,6)
CD30 (%10 eşik değer)	Pozitif	8 (%17,7)
	Negatif	37 (%82,3)

Olgulardan 19 tanesine EBV LMP1 immünohistokimyasal boyası uygulanmış olup, tümü negatiftir.

Olguların Ki-67 proliferasyon indeksleri %40-%100 arasında değişmekte olup, ortalama değeri %76,2'dir. Çalışmamızda Ki-67 proliferasyon indeksleri, 3 olguda %40-49 aralığında, 17 olguda %50-79 aralığında, 25 olguda %80-100 aralığında izlenmiştir. Ki-67 ile CD30 haricindeki immünohistokimyasal

parametreler, moleküler ve klinik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Ki-67 proliferasyon indeksinin %10'luk aralıklar halinde dağılımı ve immünohistokimyasal, moleküler, klinik parametrelere göre dağılımı Şekil 4.6 ve Tablo 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.6. DLBCL, NOS olgularında Ki-67 proliferasyon indeksi dağılımları

Tablo 4.5. Ki-67 proliferasyon indeksi dağılımları

		%40-49	%50-79	%80-100	Toplam
Moleküler Tip	GCB tip	1	5	9	15
	ABC tip	2	12	16	30
BCL2 SP66 Ekspresyonu	Pozitif	1	2	8	11
	Negatif	2	15	17	34
CMYC Protein Ekspresyonu	Pozitif	3	11	10	24
	Negatif	0	6	15	21
Double Ekspresyon	Var	3	12	14	29
	Yok	0	5	11	16
CD30 Ekspresyonu (%1 eşik değeri)	Pozitif	1	14	19	34
	Negatif	2	3	6	11
FISH ile BCL6	Normal	1	6	8	15
	Translokasyon	0	7	11	18
	Monozomi	1	1	2	4
	Trizomi	0	0	2	3
	Polizomi	1	1	2	5
FISH ile BCL2	Normal	1	10	13	24
	Translokasyon	0	2	1	3
	Monozomi	1	0	3	4
	Trizomi	0	2	3	5
	Polizomi	1	3	5	9
FISH ile MYC	Normal	1	10	14	25
	Translokasyon	0	2	3	5
	Monozomi	1	1	3	5
	Polizomi	1	4	5	10
Ann-Arbor Evre	Evre 1	1	3	5	9
	Evre 2	0	3	3	6
	Evre 3	1	6	7	14
	Evre 4	0	3	4	7
LDH Düzeyi	Düşük	1	6	5	12
	Yüksek	1	9	14	24
IPI Skoru	Düşük	1	3	5	9
	Düşük-orta	0	6	3	9
	Yüksek-orta	1	3	8	12
	Yüksek	0	3	3	6

FISH analizi

FISH ile BCL2 analizinde 3 (%6,7) olguda translokasyon, Olguların 14 (%31,1)'ünde BCL2 kopya sayısı artışı gözlenmiştir. Bu olguların 5 (%11,1)'inde trizomi, 9 (%20)'unda polizomi izlenmiş, 4 (%8,9) olguda monozomi saptanmıştır. 24 (%53,3) olgu normal olup, herhangi bir anomali gözlenmemiştir (Tablo 4.6).

FISH ile BCL6 analizinde 18 (%40) olguda translokasyon, 8 (%17,8) olguda BCL6 kopya sayısı artışı saptanmıştır. Bu olgulardan 3 (%6,7) olguda trizomi, 5 (%11,1) olguda polizomi, 4 (%8,9) olguda monozomi saptanmıştır. 15 (%33,3) olgu normal görünümündedir (Tablo 4.6).

FISH ile MYC analizinde 5 (%11,1) olguda translokasyon, 10 (%22,2) olguda MYC kopya sayısı artışı saptanmış olup, tümü polizomi şeklindedir. Olgulardan 5 (%11,1)'inde monozomi saptanmıştır. Trizomi izlenmemiştir. 25 (%55,6) olgu ise normal görünümündedir (Tablo 4.6).

Bulgulara göre polizomi en çok MYC ve BCL2 geninde, trizomi en çok BCL2 geninde izlenmiştir. Monozomi görülme sıklığı BCL2, BCL6 ve MYC genlerinde benzerdir.

Tablo 4.6. FISH ile BCL2, BCL6 ve MYC çalışma sonuçları

	BCL2	BCL6	MYC
Normal	24 (%53,3)	15 (%33,3)	25 (%55,6)
Translokasyon	3 (%6,7)	18 (%40)	5 (%11,1)
Monozomi	4 (%8,9)	4 (%8,9)	5 (%11,1)
Trizomi	5 (%11,1)	3 (%6,7)	0
Polizomi	9 (%20)	5 (%11,1)	10 (%22,2)

Bazı olgularda BCL2, BCL6 ve MYC genlerinde kopya sayısı artışı birliktelik gösterdiği saptanmıştır.

BCL2 ve BCL6 kopya sayısı artışında birliktelik 6 vakada mevcut olup, 4 olguda her iki gende polizomi, 2 olguda trizomi görülmüştür. Ayrıca 2 olguda, BCL2 ve BCL6 genlerinin her ikisinde monozomi saptanmıştır.

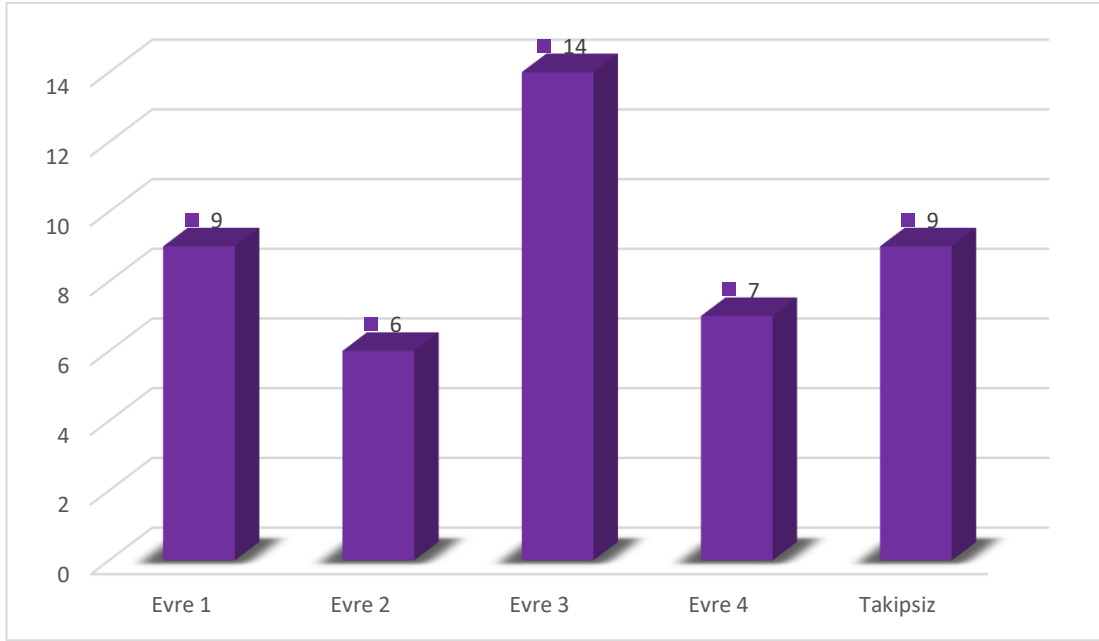
MYC ve BCL6 kopya sayısı artışında birliktelik 3 vakada mevcut olup, her iki gende polizomi izlenmiştir. Ayrıca 2 olguda, MYC ve BCL6 genlerinin her ikisinde monozomi saptanmıştır.

MYC ve BCL2 kopya sayısı artışında birliktelik 5 vakada mevcut olup, her iki gende polizomi izlenmiştir. Ayrıca 2 olguda, MYC ve BCL2 genlerinin her ikisinde monozomi saptanmıştır.

Klinik prognostik faktörler

Olgulardan 36 tanesinin klinik ve laboratuvar verilerine ulaşılabilmiş olup, 9 hastanın hastanemizde klinik takibi olmadığından Ann-Arbor evresi, LDH düzeyi, ektranodal tutulum sayısı ve ECOG bilgilerine ulaşılamamıştır. Bu nedenle bu 9 olgunun IPI skoru da hesaplanamamıştır. Klinik veriler ve IPI skoru ile yapılan istatistiksel analizlerde 36 olgu üzerinden değerlendirme yapılmıştır.

36 olgunun 9 (%20)'ü Ann-Arbor evre 1, 6 (%13,3)'sı Ann-Arbor evre 2, 14 (%31,1)'ü Ann-Arbor evre 3, 7 (%15,6)'si Ann-Arbor evre 4 olarak izlenmiştir. 9 olgunun daha önce de bahsedildiği gibi, klinik takibi yoktur. Bu yüzden evreleri belirlenememiştir (Şekil 4.7).



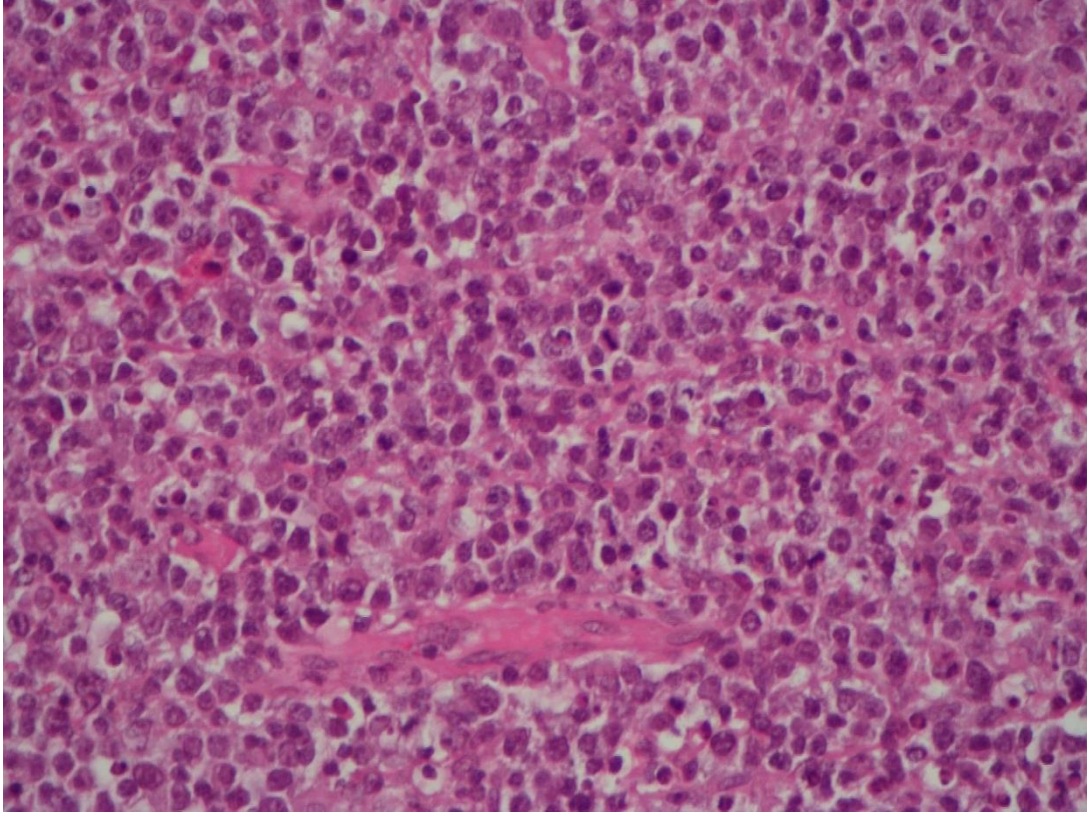
Şekil 4.7. DLBCL, NOS olgularının Ann-Arbor Evreleri

Labaratuvar verilerine ulaşılabilen 36 hastadan 12 (%26,7)'sinin LDH düzeyi düşük, 24 (%53,3)'ünün LDH düzeyi yüksektir. 36 olgunun ektranodal tutulum sayısı değerlendirilebilmiş olup 0-4 arasında değişmektedir. 36 olgudan 33 (%73,3)'ünün ECOG skoru 1, 3 (%6,7)'ünün ECOG skoru 2'dir. Bu parametrelere göre 36 olgunun IPI skoru hesaplanmıştır. 36 olgudan 9 (%20)'u IPI skoruna göre düşük risk, 9 (%20)'u düşük-orta risk, 12 (%26,7)'si yüksek-orta risk, 6 (%13,3)'sı yüksek risk kategorisindedir (Tablo 4.7).

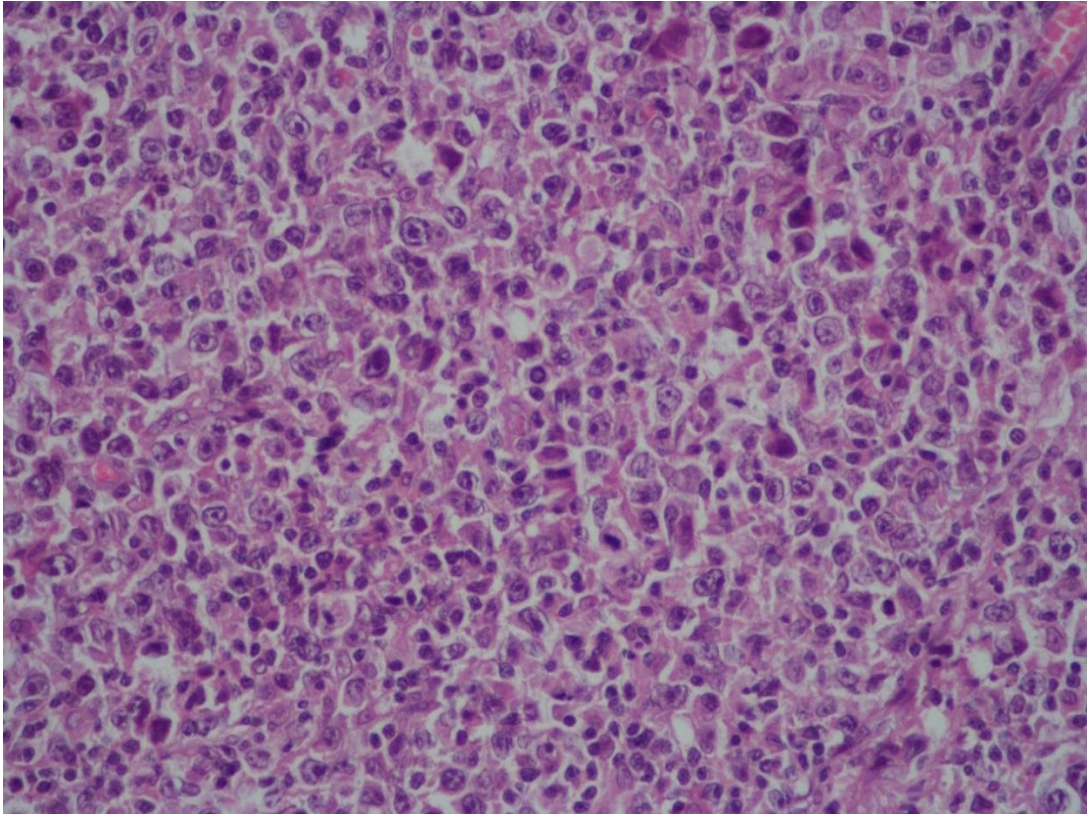
Tablo 4.7. DLBCL, NOS olgularının IPI skoruna göre risk kategorileri

Düşük risk	9 (%20)
Düşük-orta risk	9 (%20)
Yüksek-orta risk	12 (%26,7)
Yüksek risk	6 (%13,3)
Takipsiz	9 (%20)

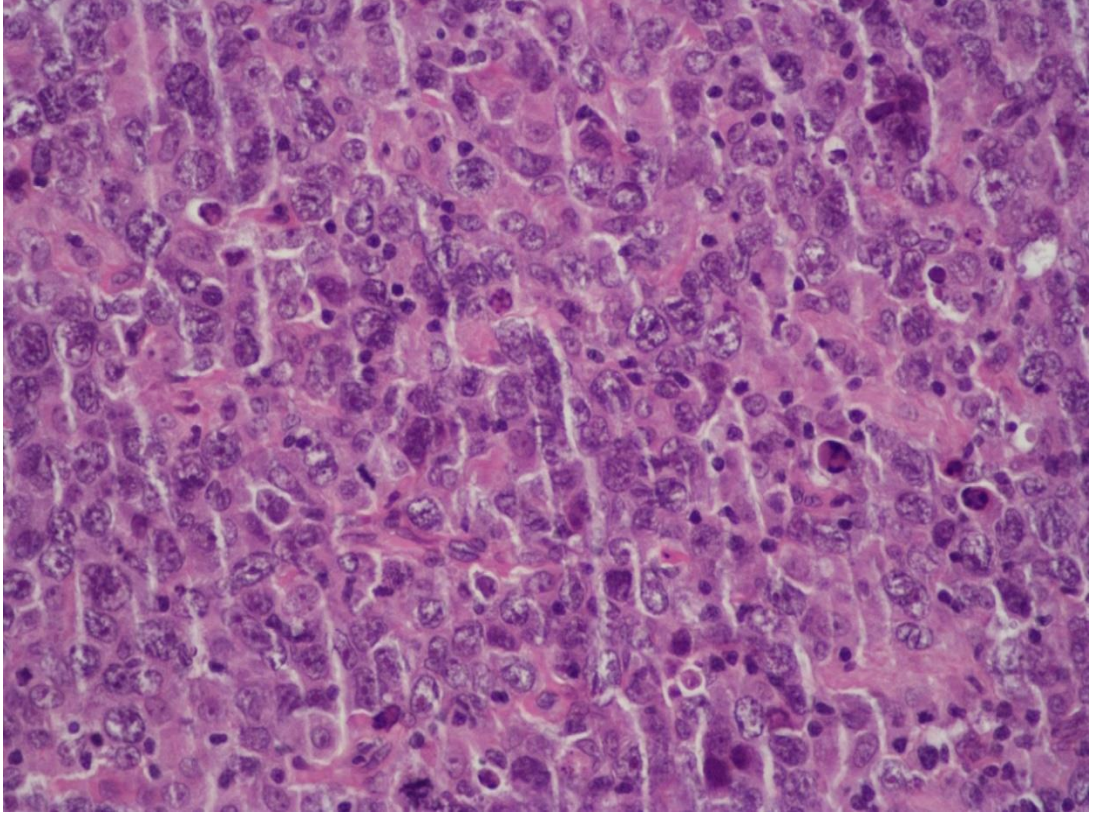
Olgulardan bir kısmına ait hematoksilen eozin, immünohistokimyasal boyama ve FISH çalışması örnekleri ‘Şekil 4.8- 4.26’de gösterilmiştir.



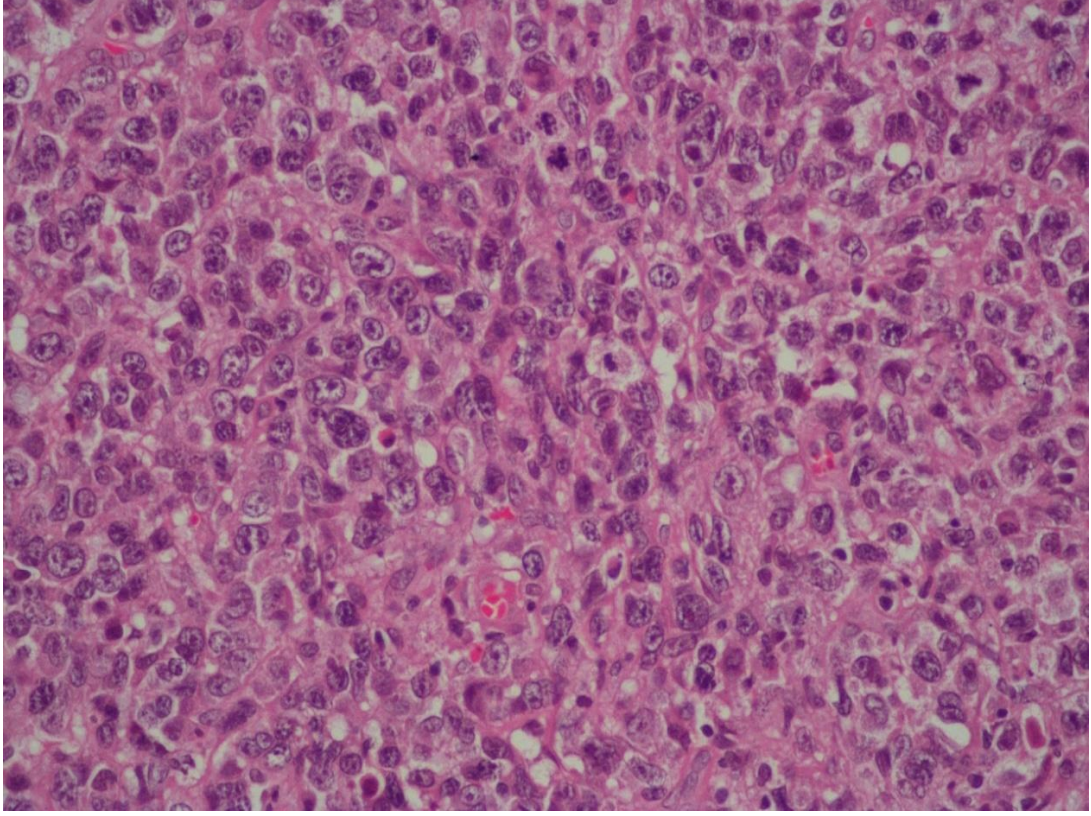
Şekil 4.8. Sentroblastik, monomorfik tip (H&E, x400)



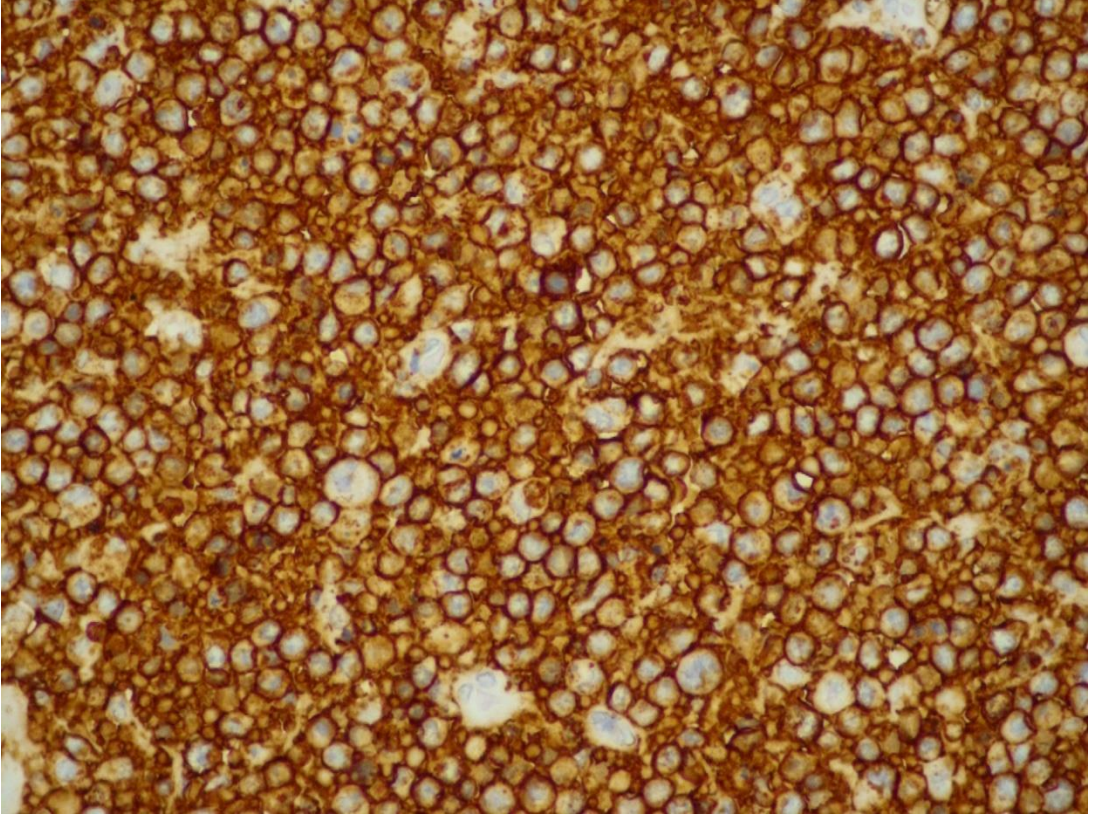
Şekil 4.9. Sentroblastik, polimorfik tip (H&E, x400)



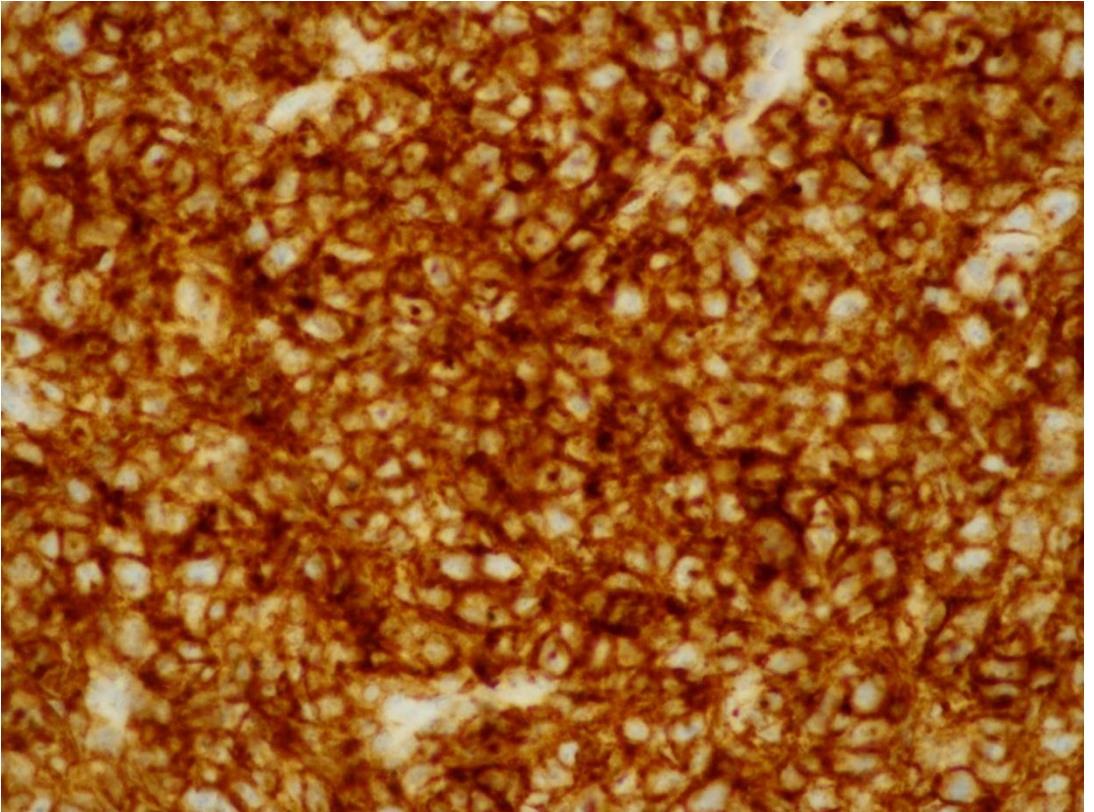
Şekil 4.10. Anaplastik tip (H&E, x400)



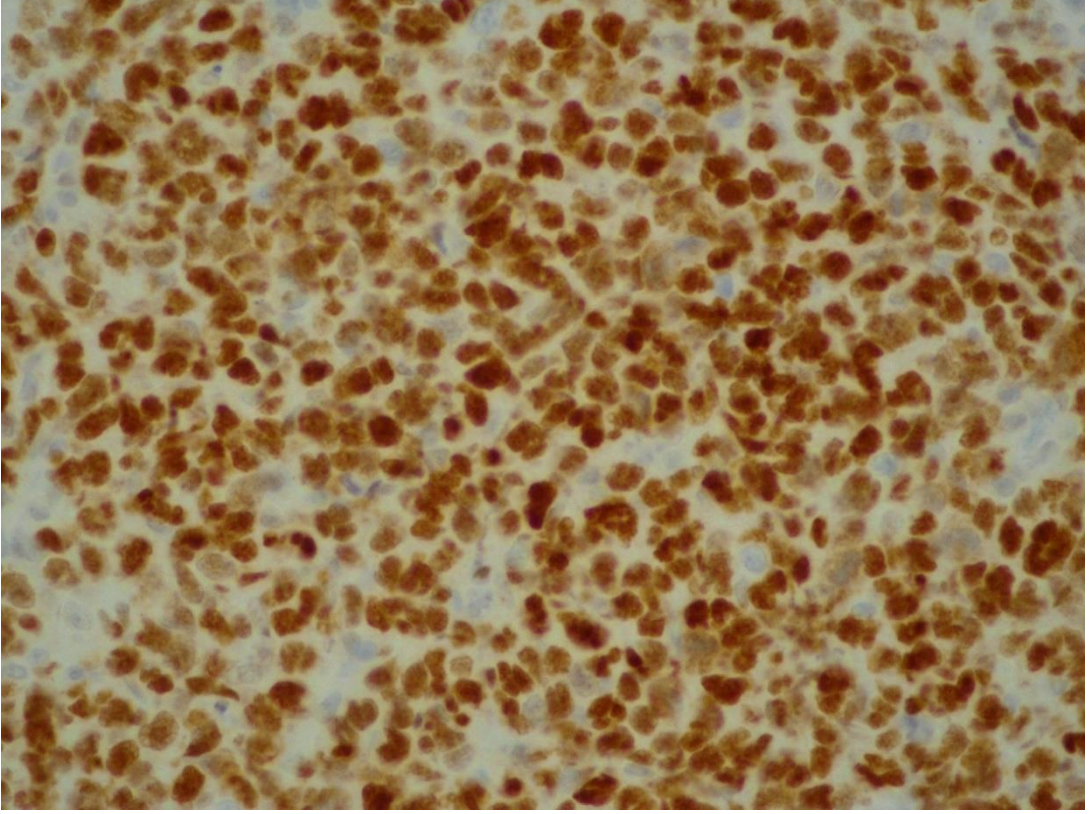
Şekil 4.11. Sınıflandırılmayan tip, sentroblast-immünoblast arası hibrid özellikler içeren (H&E, x400)



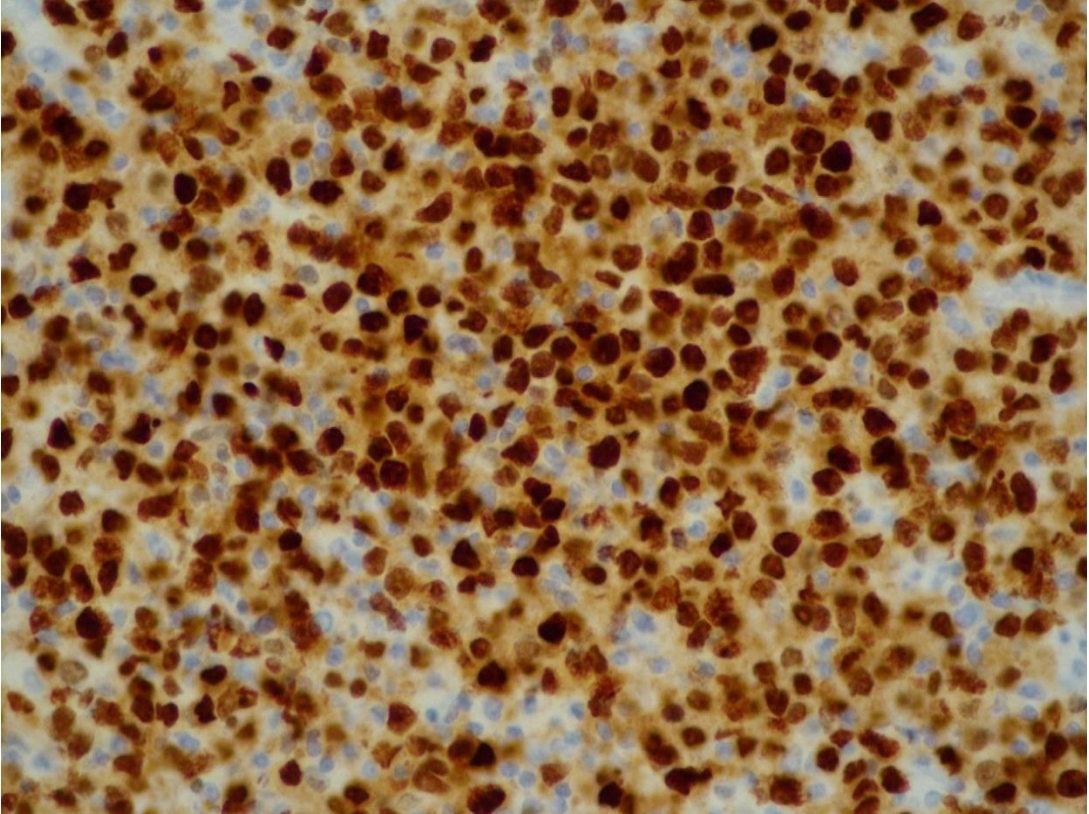
Şekil 4.12. DLBCL, NOS olgusunda CD20 pozitifliği (x400)



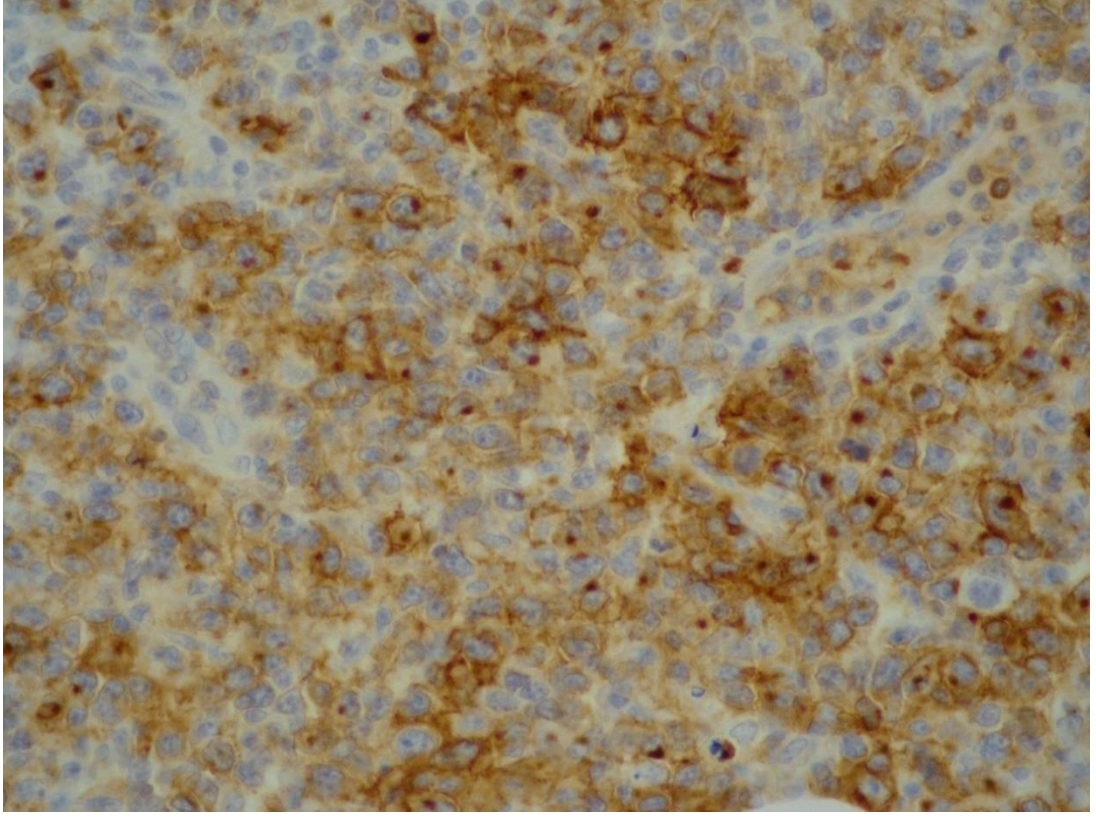
Şekil 4.13. GCB alt tip, CD10 pozitifliği (x400)



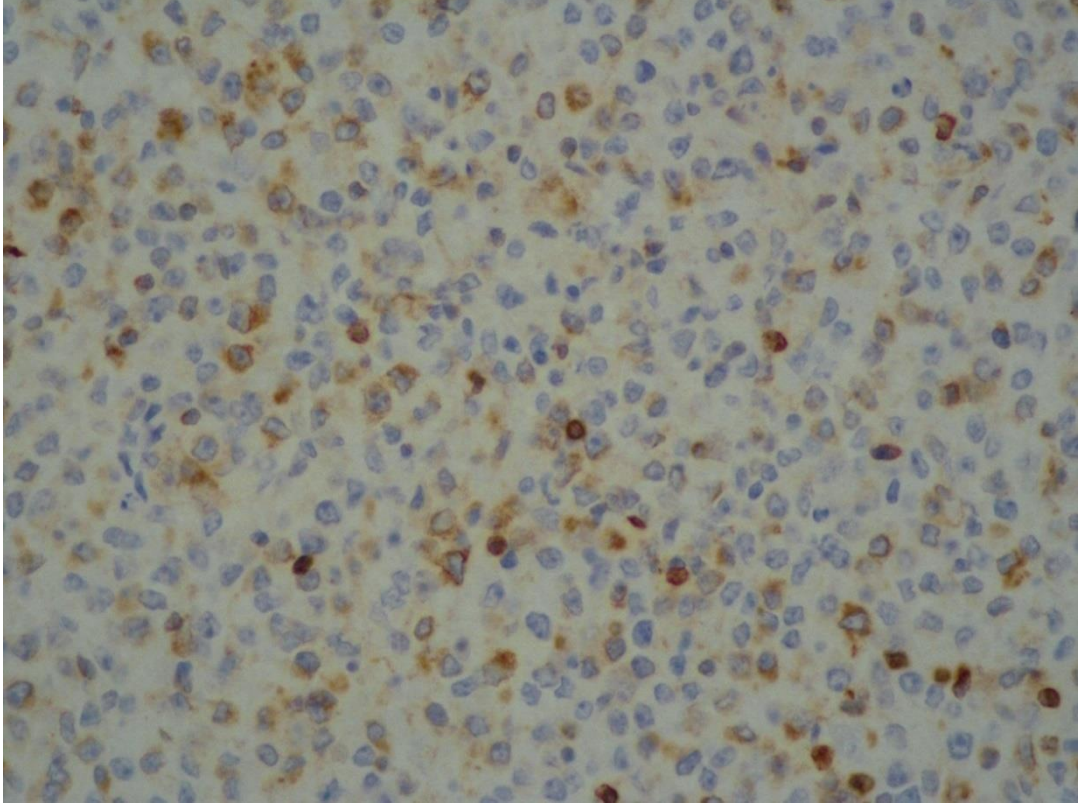
Şekil 4.14. GCB alt tip, BCL6 pozitifliği (x400)



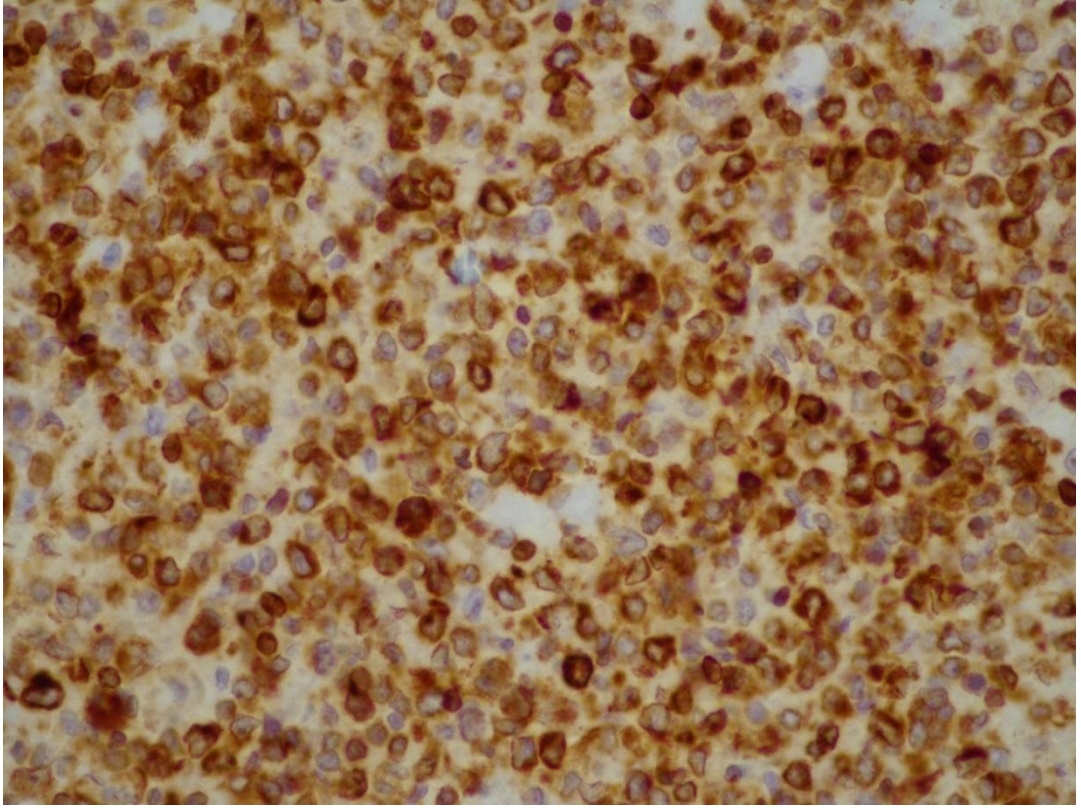
Şekil 4.15. ABC alt tip, MUM1 pozitifliği (x400)



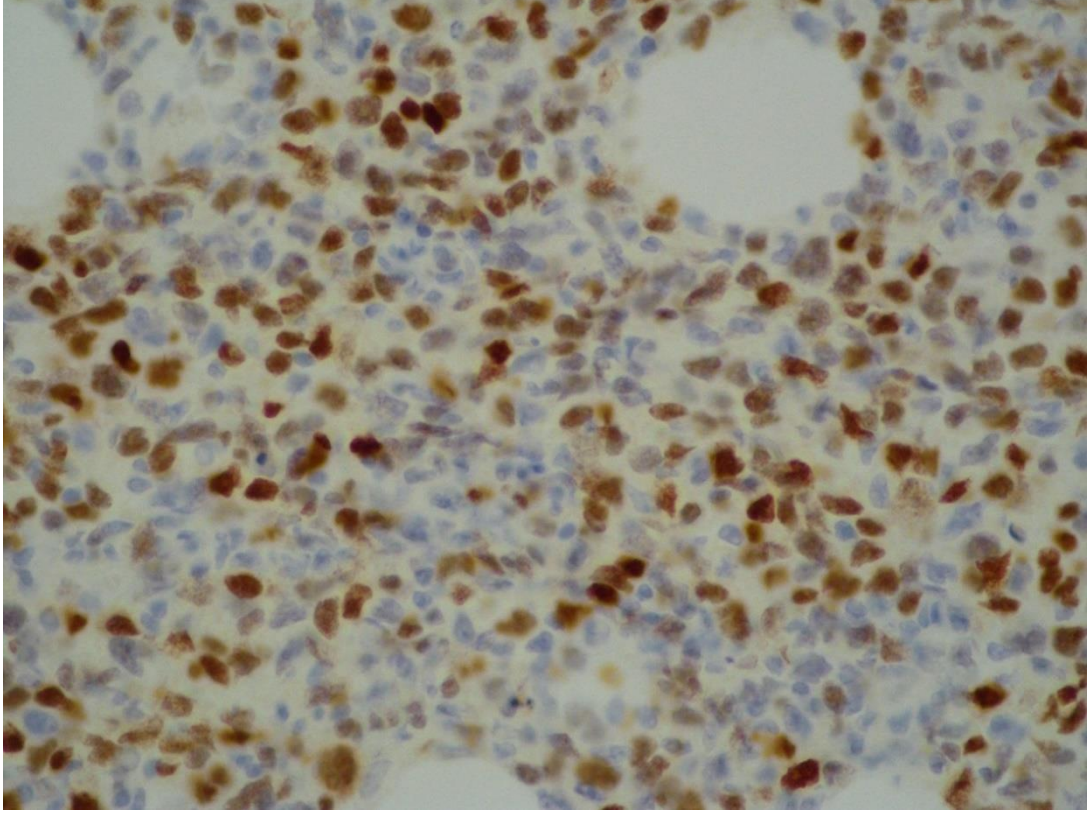
Şekil 4.16. CD30 ekspresyonu, %70 (x400)



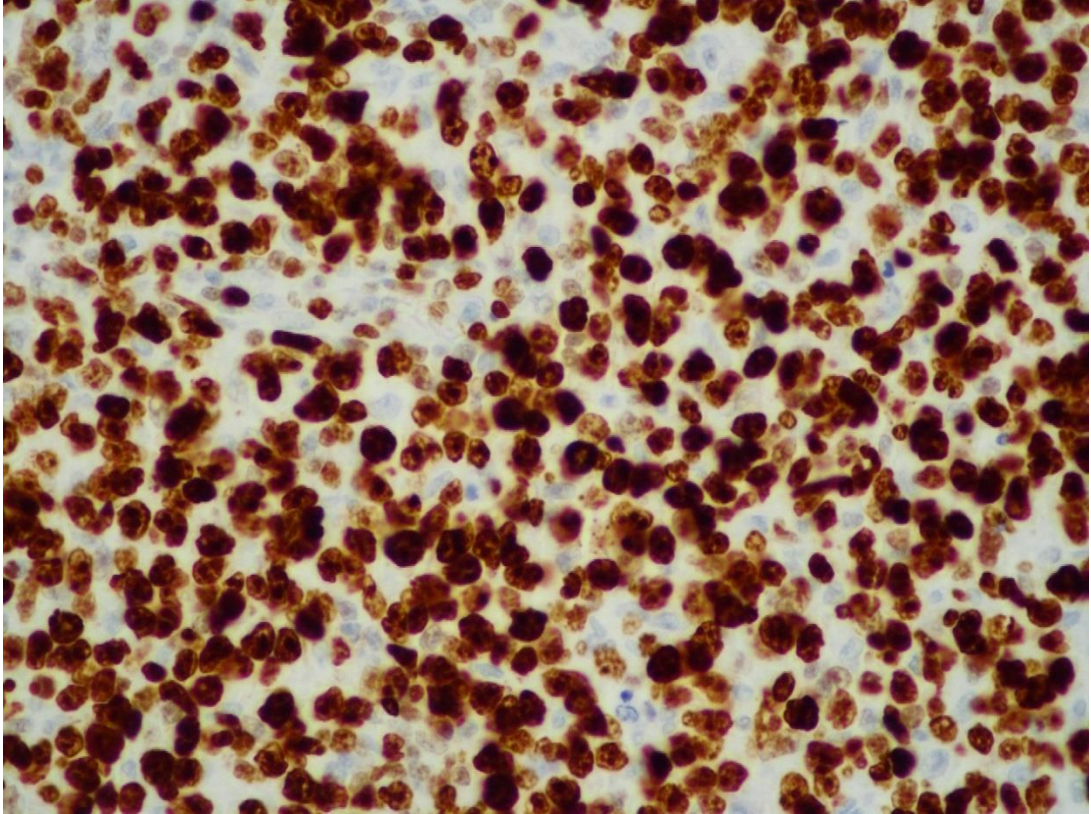
Şekil 4.17. DLBCL, NOS olgusunda BCL2, "Clone 124" negatifliği (x400)



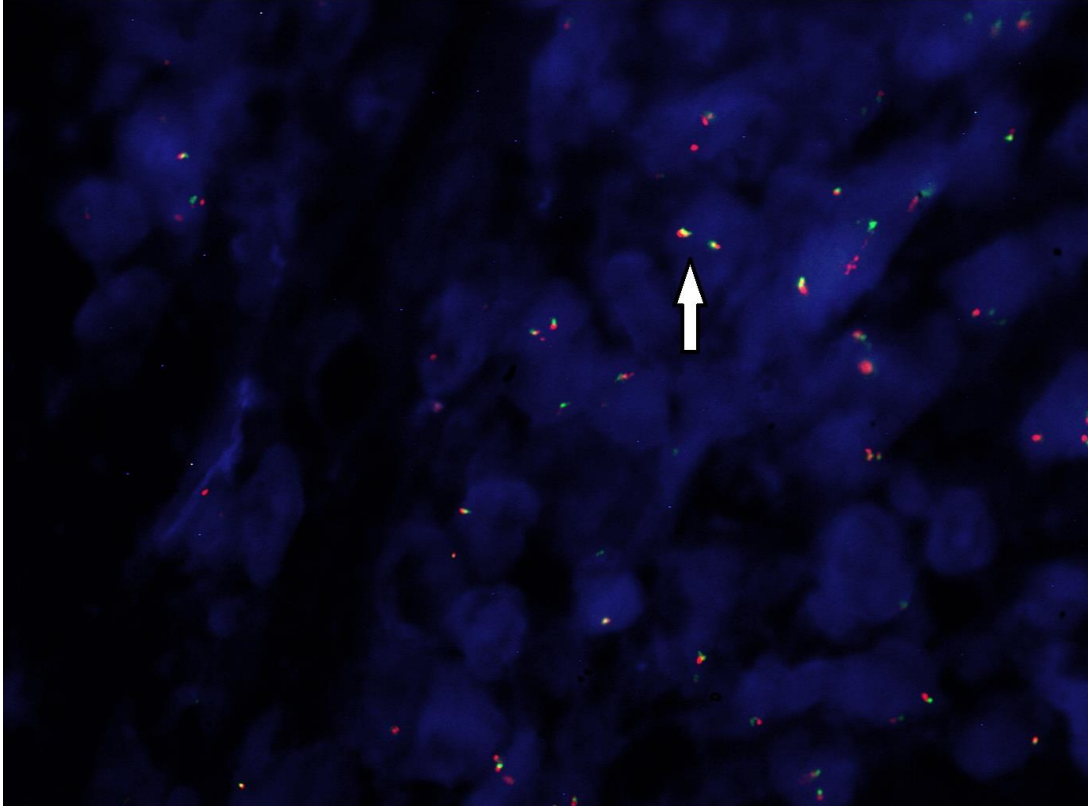
Şekil 4.18. BCL2 "Clone 124" negatif olguda BCL2 SP66 pozitifliği (x400)



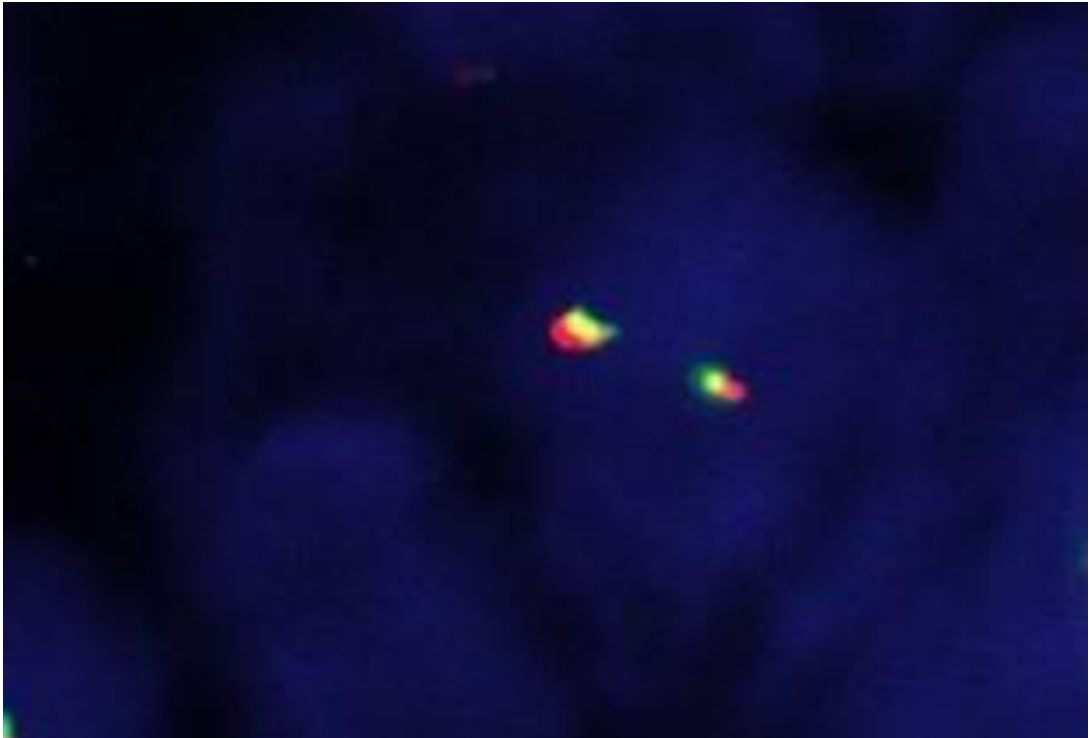
Şekil 4.19. DLBCL, NOS olgusunda CMYC protein pozitifliği (x400)



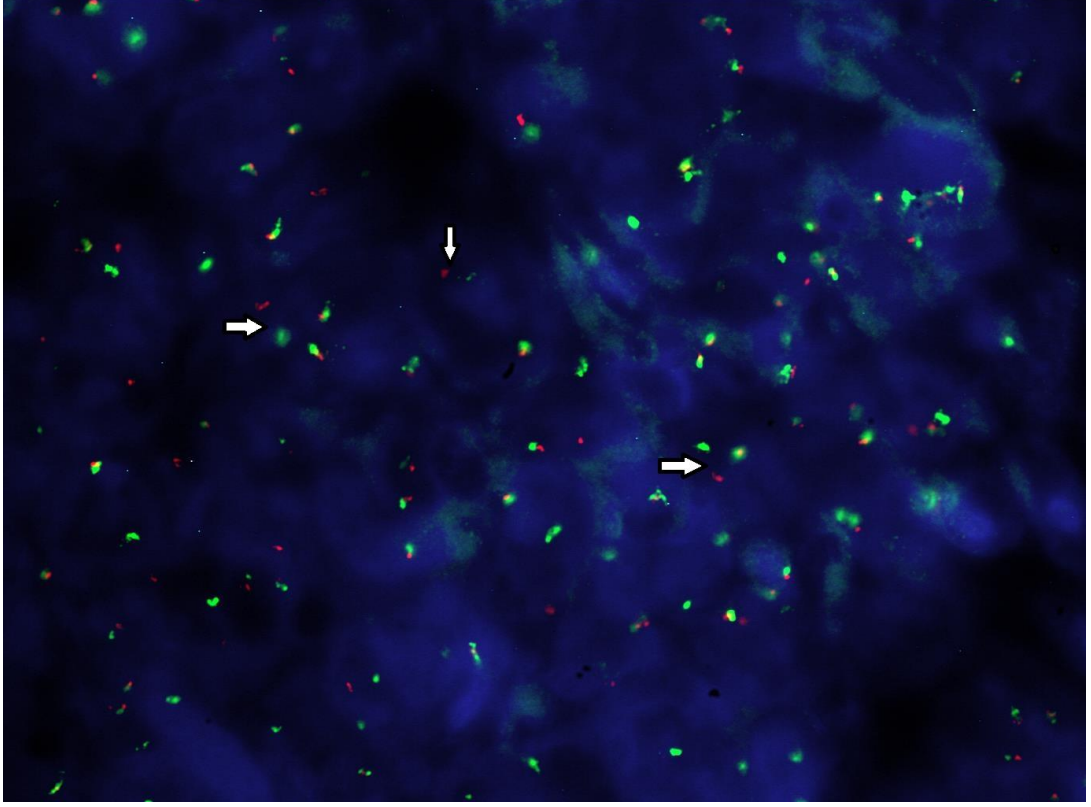
Şekil 4.20. DLBCL, NOS olgusunda yüksek Ki-67 proliferasyon indeksi (x400)



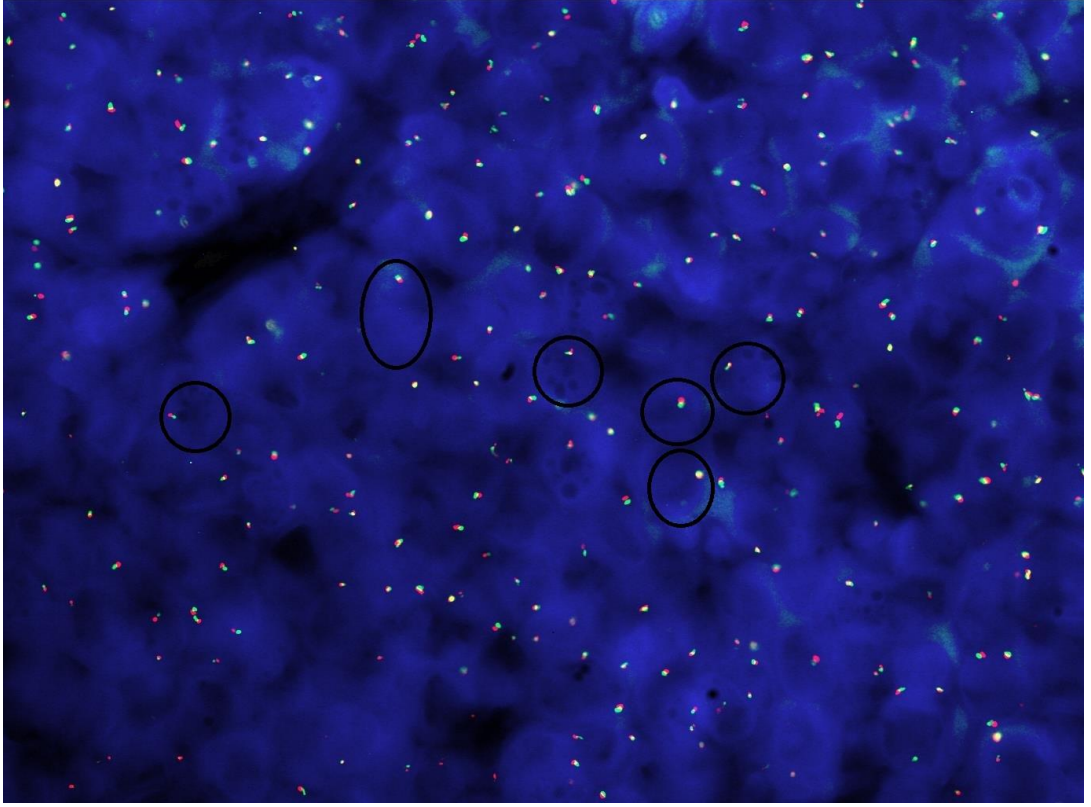
Şekil 4.21. FISH BCL2 normal hücre, çift füzyon sinyali (x1000)



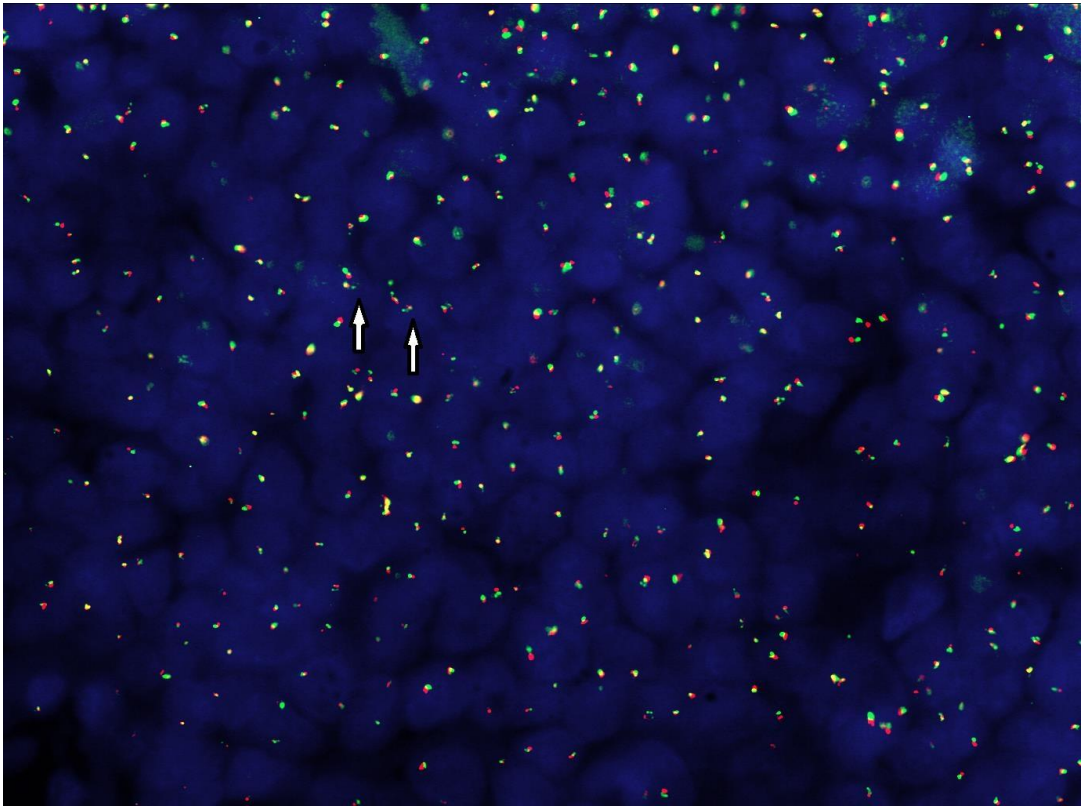
Şekil 4.22. FISH BCL2 normal hücre, çift füzyon sinyali



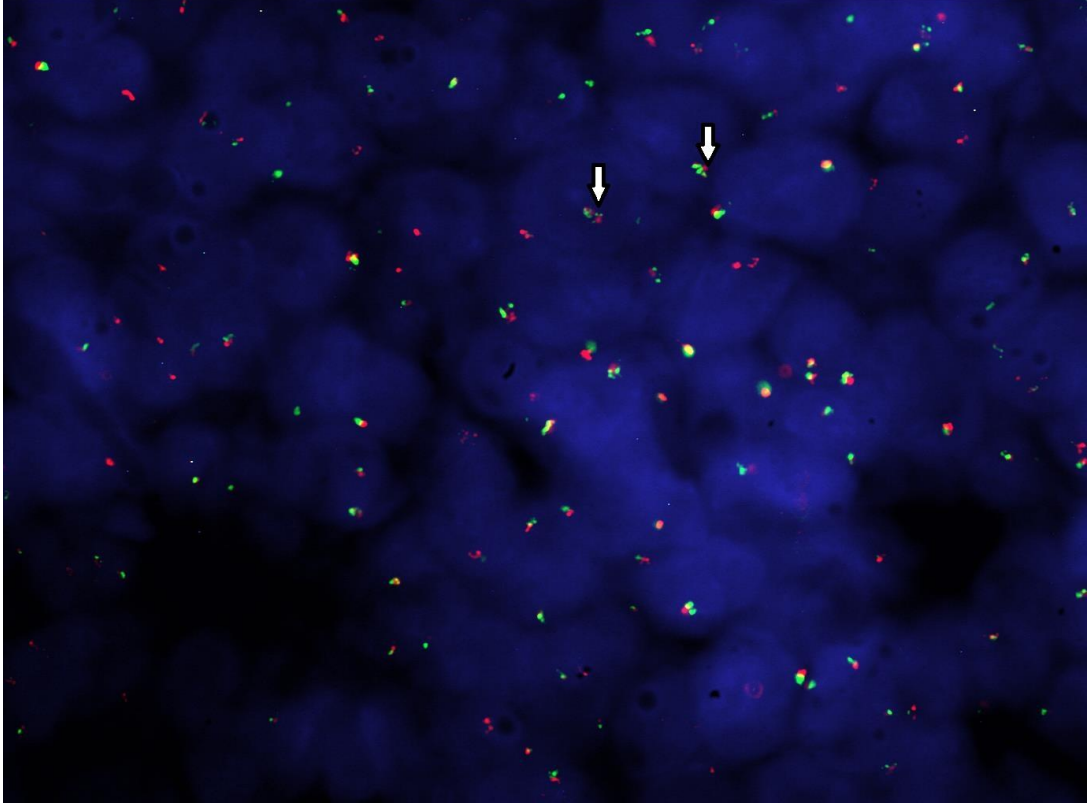
Şekil 4.23. FISH BCL6 Translokasyon görüntüsü, tek alele ayrı yeşil ve kırmızı sinyal (x1000)



Şekil 4.24. FISH MYC Monozomi görüntüsü, tek füzyon sinyali (x1000)



Şekil 4.25. FISH MYC Polizomi görüntüsü (x600)



Şekil 4.26. FISH, MYC Polizomi, 3 ve daha fazla sayıda yeşil sinyal görüntüsü (x1000)

4.2. Klinik, Morfolojik, İmmünohistokimyasal ve Moleküler Bulguların Birbirleriyle İlişkisi

Olguların yaşları ile morfolojik, immünohistokimyasal, moleküler ve diğer klinik bulguları karşılaştırılmış, istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Olguların nodal veya ektranodal olma durumları ile morfolojik, immünohistokimyasal BCL2, BCL6, CMYC protein, CD30 ekspresyonları, moleküler ve diğer klinik bulgular karşılaştırılmıştır. Nodal-ektranodal olma durumu ile BCL2 protein ekspresyonu, Ann-Arbor evresi, LDH düzeyi ve IPI skoru arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur (Tablo 4.8-11). Nodal olguların %84'ünde BCL2 pozitifliği gözlenirken, primer ektranodal olguların sadece %33,3'ünde BCL2 pozitifliği mevcuttur. BCL2'nin 'clone 124' ve 'SP66' olmak üzere her iki klonu ile de istatistiksel anlamlılık mevcuttur (sırasıyla p değeri 0,020;0,003). Ayrıca primer ektranodal olgularda, nodal ve sekonder ektranodal olgulara göre evre, LDH düzeyi ve IPI skoru düşük izlenmiştir (p=0,000, p=0,002, p=0,000). Nodal-ektranodal durumu ile BCL6, CMYC protein, CD30 ekspresyonu ve moleküler bulgular arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Tablo 4.8. Nodal-Ektranodal kategori ile BCL2 SP66 karşılaştırılması

		Grup				Toplam (P=0,003)
		Nodal	Sekonder Ektranodal	Primer Ektranodal	Takipsiz Ektranodal	
BCL2 SP66	Negatif	2	1	6	2	11
	Pozitif	17	12	3	2	34
Toplam		19	13	9	4	45

Tablo 4.9. Nodal-Ekstranodal kategori ile Ann-Arbor evre karşılaştırılması

		Grup			Toplam (P=0,000)
		Nodal	Sekonder Ekstranodal	Primer Ekstranodal	
Ann-Arbor Evre	Evre 1	1	0	8	9
	Evre 2	4	2	0	6
	Evre 3	8	6	0	14
	Evre 4	1	5	1	7
Toplam		14	13	9	36

Tablo 4.10. Nodal-Ekstranodal kategori ile LDH düzeyi karşılaştırılması

		Grup			Toplam (P=0,002)
		Nodal	Sekonder Ekstranodal	Primer Ekstranodal	
LDH Düzeyi	Düşük	4	1	7	12
	Yüksek	10	12	2	24
Toplam		14	13	9	36

Tablo 4.11. Nodal-Ekstranodal kategori ile IPI skoru karşılaştırılması

		Grup			Toplam (P=0,000)
		Nodal	Sekonder Ekstranodal	Primer Ekstranodal	
IPI Skoru	Düşük Risk	1	1	7	9
	Düşük-Orta Risk	7	1	1	9
	Yüksek-Orta Risk	5	7	0	12
	Yüksek Risk	1	4	1	6
Toplam		14	13	9	36

Morfolojik tip ile klinik, BCL2, BCL6, CMYC protein, CD30 ekspresyonları ve moleküler bulgular istatistiksel analiz ile karşılaştırılmış, anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Moleküler tip ile tüm klinik, morfolojik, immünohistokimyasal ve moleküler parametreler karşılaştırıldığında, moleküler alt tip ile BCL2'nin her iki klonu arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (Tablo 4.12-13). Non-GCB tipte BCL2 ekspresyonu daha sık gözlenmiştir. ‘‘SP66’’ klonu ile 30 Non-GCB tipte olgunun 28 (%93,3)'inde BCL2 pozitifliği izlenmiş olup, 15 GCB tipte olgunun sadece 6 (%40)'sında pozitiflik mevcuttur (p=0,000).

Çalışmamızda ‘‘BCL2-CMYC Double ekspresör’’ kategoride olan 16 (%35,5) olgu saptanmış olup moleküler alt tipler ile arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur (p=0,004). ‘‘Double ekspresör’’ kategorideki 16 olgunun 15 (%93,7)'i Non-GCB alt tiptedir (Tablo 4.14).

Tablo 4.12. Moleküler alt tip ile BCL2, ‘‘Clone 124’’ ilişkisi

		BCL2 ‘‘Clone 124’’		Toplam (P=0,004)
		Negatif	Pozitif	
Moleküler Tip	GCB	9	6	15
	Non-GCB	4	26	30
Toplam		13	32	45

Tablo 4.13. Moleküler alt tip ile BCL2, SP66 ilişkisi

		BCL2, SP66		Toplam (P=0,000)
		Negatif	Pozitif	
Moleküler Tip	GCB	9	6	15
	Non-GCB	2	28	30
Toplam		11	34	45

Tablo 4.14. Moleküler alt tip ile double ekspresyon ilişkisi

		Double Ekspresyon		Toplam (P= 0,004)
		Yok	Var	
Moleküler Tip	GCB	14	1	15
	Non-GCB	15	15	30
Toplam		29	16	45

BCL2 ‘‘clone 124’’ ve ‘‘SP66’’ ile tüm morfolojik, klinik, immünohistokimyasal ve moleküler parametreler arasındaki ilişki değerlendirilmiştir (Nodal-ekstranodal kategori ve moleküler alt tiplerle ilişkisinden daha önce bahsedilmiştir). Her iki klonla Ann-Arbor evre ve MUM1 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). CD10 ile sadece ‘‘SP66’’ klonu arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmış olup, ‘‘clone 124’’ ile saptanmamıştır.

BCL2 ekspresyonu ile Ann-Arbor evre arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır (Tablo 4.15-4.16). ‘‘Clone 124’’ ile evre 4 gruptaki 7 olgunun 7 (%100)’sinde pozitiflik gözlenmiş olup evre 1 gruptaki 9 olgunun sadece 2 (%22,2)’sinde pozitiflik mevcuttur ($p=0,003$). SP66 ile evre 4 gruptaki 7 olgunun 7 (%100)’sinde pozitiflik gözlenirken, evre 1 gruptaki 9 olgunun 3 (%33,3)’ünde pozitiflik izlenmiştir ($p=0,005$). Yüksek evre olgularda BCL2 ekspresyonunun her iki klonla da daha sık olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.15. BCL2, ‘‘Clone 124’’ ile Ann-Arbor evre ilişkisi

		BCL2, ‘‘Clone 124’’		Toplam (P=0,003)
		Negatif	Pozitif	
Ann-Arbor Evre	Evre 1	7	2	9
	Evre 2	1	5	6
	Evre 3	3	11	14
	Evre 4	0	7	7
Toplam		11	25	36

Tablo 4.16. BCL2, SP66 ile Ann-Arbor evre ilişkisi

		BCL2, SP66		Toplam (P=0,005)
		Negatif	Pozitif	
Ann-Arbor Evre	Evre 1	6	3	9
	Evre 2	0	6	6
	Evre 3	3	11	14
	Evre 4	0	7	7
Toplam		9	27	36

BCL2'nin her iki klonu ile MUM1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır (Tablo 4.17-18). "Clone 124" ile MUM1 pozitif 32 olgunun 27 (%84,4)'sinde BCL2 pozitifliği izlenmiştir. MUM1 negatif 13 olgunun ise sadece 5 (%38,5)'inde BCL2 pozitifliği mevcuttur (p=0,004). SP66 ile MUM1 pozitif 32 olgunun 29 (%90,6)'unda BCL2 pozitifliği mevcuttur. MUM1 negatif 13 olgunun ise sadece 5 (%38,5)'inde BCL2 pozitifliği gözlenmiştir (p=0,001).

Tablo 4.17. BCL2, "Clone 124" ile MUM1 ekspresyonu ilişkisi

		BCL2, "Clone 124"		Toplam (P=0,004)
		Negatif	Pozitif	
MUM1	Negatif	8	5	13
	Pozitif	5	27	32
Toplam		13	32	45

Tablo 4.18. BCL2, SP66 ile MUM1 ekspresyonu ilişkisi

		BCL2, SP66		Toplam (P=0,001)
		Negatif	Pozitif	
MUM1	Negatif	8	5	13
	Pozitif	3	29	32
Toplam		11	34	45

BCL2, SP66 ile CD10 ekspresyonu arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulunmuştur (p=0,028). Hans algoritmasında GCB tip

sınıflamasında kullanılan CD10 ekspresyonu olan olgularda, BCL2 ekspresyon sıklığı azdır. CD10 negatif olguların %83,3'ünde BCL2 pozitifliği izlenmiş olup, CD10 pozitif olguların sadece %44,4'ünde BCL2 pozitifliği mevcuttur (Tablo 4.19). Ancak aynı istatistiksel anlamlı ilişki "clone 124" ile saptanamamıştır.

Tablo 4.19. BCL2, SP66 ile CD10 ekspresyonu ilişkisi

		BCL2, SP66		Toplam (P=0,028)
		Negatif	Pozitif	
CD10	Negatif	6	30	36
	Pozitif	5	4	
Toplam		11	34	45

CMYC protein ekspresyonu ile tüm klinik, histopatolojik, immünohistokimyasal ve moleküler bulgular karşılaştırılmış, sadece CD10 ekspresyonu ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur (p=0,025). CMYC pozitif 21 olgunun 20 (%95,2)'sinde CD10 negatiftir (Tablo 4.20)

Tablo 4.20. CMYC protein ekspresyonu ile CD10 ekspresyonu ilişkisi

		CMYC		Toplam (P=0,025)
		Negatif	Pozitif	
CD10	Negatif	16	20	36
	Pozitif	8	1	
Toplam		24	21	45

Hedefe yönelik tedavi seçeneği ve prognoz açısından önemi olan CD30 ekspresyonu ile tüm klinik, morfolojik, BCL2, BCL6, CMYC protein ekspresyonları ve gen anormallikleri karşılaştırılmıştır.

CD30 (%1 eşik değer) pozitifliği ile BCL6 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır (p=0,025). BCL6 pozitif 39 olgunun 32'sinde CD30 (%1 eşik değer) negatiftir (Tablo 4.21). BCL6 ekspresyonu ile CD30 (%1 eşik

değer) arasında ters ilişki vardır. Ancak aynı istatistiksel anlamlı ilişki CD30 (%10 eşik değer) ile saptanmamıştır.

Tablo 4.21. CD30 (%1 eşik değer) ile BCL6 ekspresyonu ilişkisi

		CD30 (%1 eşik değer)		Toplam (P=0,025)
		Negatif	Pozitif	
BCL6	Negatif	2	4	6
	Pozitif	32	7	39
Toplam		34	11	45

CD30 ekspresyonu ile MYC gen anormallikleri karşılaştırıldığında CD30 (%1 eşik değer) pozitif çoğu olguda, MYC translokasyonu veya kopya sayısı artışı görülmemiştir (Tablo 4.22).

Tablo 4.22. CD30 (%1 eşik değer) ekspresyonu ile MYC translokasyonu ve kopya sayısı artışının karşılaştırılması

		CD30 (%1 eşik değer)		Toplam (P=0,070)
		Negatif	Pozitif	
MYC translokasyonu veya kopya sayısı artışı	Yok	20	10	30
	Var	14	1	15
Toplam		34	11	45

CD30 ile BCL2 ve CMYC protein ekspresyonları ve BCL6, BCL2 gen anormallikleri arasında ilişki saptanmamıştır.

CD30 ekspresyonu (%10 eşik değerine göre) ile Ki-67 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur (p=0,045). CD30 (%10 eşik değerine göre) pozitif olguların %75'inde, Ki-67 proliferasyon indeksi %90 üzerindedir (Tablo 4.23).

Tablo 4.23. CD30 ekspresyonu (%10 eşik değer) ile Ki-67 proliferasyon indeksi ilişkisi

		CD30 (%10 eşik değer)		Toplam (P=0,045)
		Negatif	Pozitif	
Ki-67 proliferasyon indeksi	%90 altı	25	2	27
	%90 üzeri	12	6	18
Toplam		37	8	45

Moleküler çalışmalarda; FISH ile BCL6 analiz sonuçları ile FISH ile BCL2 analiz sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gözlenmiştir (p=0,001). BCL6 polizomisi olan olguların %80'inde BCL2 polizomisi de eşlik etmektedir (Tablo 4.24). BCL2 kopya sayısı artışı olan 14 olgunun 12 (%85,7)'sinde BCL6 kopya sayısı artışı (6 olgu) veya translokasyonu (6 olgu) eşlik etmektedir. BCL6 kopya sayısı artışı olan 8 olgunun 6 (%75)'sında BCL2 kopya sayısı artışı veya translokasyonu eşlik etmektedir. BCL6 translokasyon veya kopya sayısı artışının, BCL2 translokasyon veya kopya sayısı artışı ile sıklıkla birliktelik gösterdiği izlenmektedir.

Tablo 4.24. BCL2 ve BCL6 FISH çalışma sonuçlarının karşılaştırılması

		BCL6					Toplam (P=0,001)
		Normal	Translokasyon	Monozomi	Trizomi	Polizomi	
BCL2	Normal	12	10	0	1	1	24
	Translokasyon	1	1	1	0	0	3
	Monozomi	1	1	2	0	0	4
	Trizomi	0	2	1	2	0	5
	Polizomi	1	4	0	0	4	9
Toplam		15	18	4	3	5	45

İstatiksel çalışmada BCL6 ve MYC FISH analizleri arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,01$). MYC polizomisi olan 10 olgunun 9 (%90)'unda BCL6 translokasyon (6 olgu) veya kopya sayısı artışı (3 olgu) eşlik etmektedir (Tablo 4.25).

Tablo 4.25. BCL6 ve MYC FISH çalışma sonuçlarının karşılaştırılması

		BCL6					Toplam (P=0,010)
		Normal	Translokasyon	Monozomi	Trizomi	Polizomi	
MYC	Normal	9	12	1	2	1	25
	Translokasyon	4	0	0	1	0	5
	Monozomi	2	0	2	0	1	5
	Polizomi	0	6	1	0	3	10
Toplam		15	18	4	3	5	45

BCL2 ve MYC FISH analizleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0,001$). BCL2 translokasyonu olan 3 olgunun 2 (%66,6)'sinde MYC monozomisi, 1 (%33,4)'inde MYC polizomisi eşlik etmektedir. BCL2 polizomisi olan 9 olgunun 5 (%55,6)'inde MYC polizomisi eşlik etmektedir (Tablo 4.26).

Tablo 4.26. BCL2 ve MYC FISH çalışma sonuçlarının karşılaştırılması

		MYC				Toplam (P=0,001)
		Normal	Translokasyon	Monozomi	Polizomi	
BCL2	Normal	16	5	0	3	24
	Translokasyon	0	0	2	1	3
	Monozomi	1	0	2	1	4
	Trizomi	5	0	0	0	5
	Polizomi	3	0	1	5	9
Toplam		25	5	5	10	45

FISH ile analiz edilen BCL2, BCL6, MYC gen anormallikleri tüm histopatolojik, klinik, immünohistokimyasal parametrelerle istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Bunlar arasında sadece FISH MYC sonuçları ile Ann-Arbor evre

ve LDH düzeyi arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmıştır. Ann-Arbor evre 4 olan 7 olgunun 5 (%71)'inde MYC translokasyonu veya kopya sayısı artışı mevcuttur ($p=0,044$). Evre 1 gruptaki 9 olgunun ise sadece 2 (%22)'sinde MYC translokasyon veya kopya sayısı artışı mevcuttur (Tablo 4.27). MYC translokasyon veya kopya sayısı artışının yüksek evre ile korele olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.27. MYC FISH çalışma sonuçları ile Ann-Arbor evre karşılaştırılması

		MYC Translokasyonu veya Kopya sayısı Artışı		Toplam (P=0.044)
		Yok	Var	
Ann-Arbor Evre	Evre 1	7	2	9
	Evre 2	3	3	6
	Evre 3	12	2	14
	Evre 4	2	5	7
Toplam		24	12	36

FISH ile saptanan MYC gen anormallikleri ile LDH düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki mevcuttur ($p=0,031$). MYC translokasyon veya kopya sayısı artışı olan 12 olgunun 11 (%91)'inde LDH düzeyi yüksek saptanmıştır. MYC translokasyon veya kopya sayısı artışı olmayan 24 olgunun ise 13 (%54)'ünde LDH düzeyi yüksek saptanmıştır (Tablo 4.28). İstatistiksel analiz klinik bilgileri, LDH düzeyi verileri olan 36 olguda yapılabilmiş olup, bulgular MYC translokasyon veya kopya sayısı artışı olan olgularda genellikle LDH düzeyinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.28. MYC FISH sonuçları ile LDH düzeyinin karşılaştırılması

		MYC Translokasyonu veya Kopya Sayısı Artışı		Toplam (P=0.031)
		Yok	Var	
LDH Düzeyi	Düşük	11	1	12
	Yüksek	13	11	24
Toplam		24	12	36

Çalışmamızda BCL2, BCL6, MYC protein ekspresyonları ile gen anormallikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamış olup ‘‘Tablo 4.29-4.32’’ de gösterilmiştir ($p>0,05$).

Tablo 4.29. BCL2 Clone 124 ekspresyonu ile BCL2 gen anormalliklerinin karşılaştırılması

		BCL2 Clone124		Toplam (P=0,852)
		Negatif	Pozitif	
BCL2	Normal	6	18	24
	Translokasyon	1	2	3
	Monozomi	2	2	4
	Trizomi	1	4	5
	Polizomi	3	6	9
Toplam		13	32	45

Tablo 4.30. BCL2 SP66 ekspresyonu ile BCL2 gen anormalliklerinin karşılaştırılması

		BCL2 SP66		Toplam (P=0,559)
		Negatif	Pozitif	
BCL2	Normal	5	19	24
	Translokasyon	0	3	3
	Monozomi	2	2	4
	Trizomi	1	4	5
	Polizomi	3	6	9
Toplam		11	34	45

Tablo 4.31. BCL6 ekspresyonu ile BCL6 gen anormalliklerinin karşılaştırılması

		BCL6		Toplam (P=0,292)
		Negatif	Pozitif	
BCL6	Normal	4	11	15
	Translokasyon	1	17	18
	Monozomi	1	3	4
	Trizomi	0	3	3
	Polizomi	0	5	5
Toplam		6	39	45

Tablo 4.32. CMYC protein ekspresyonu ile MYC gen anormalliklerinin karşılaştırılması

		CMYC		Toplam (P=0,538)
		Negatif	Pozitif	
MYC	Normal	11	14	25
	Translokasyon	3	2	5
	Monozomi	3	2	5
	Polizomi	7	3	10
Toplam		24	21	45

5. TARTIŞMA

Diffüz büyük B hücreli lenfoma yetişkinlerde görülen Non-Hodgkin lenfomaların yaklaşık %35'ini oluşturmaktadır. Diffüz büyük B hücreli lenfoma kategorisi klinik ve genetik özellikler, tedaviye yanıt ve prognoz açısından heterojendir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2016 lenfoma sınıflamasında, farklı klinikopatolojik ve moleküler özellikler temelinde yeni antitelere yer verilmiştir. Prognozu kötü etkilediği bilinen MYC ve BCL2 ve/veya BCL6 translokasyonu saptanan olgular yüksek dereceli B hücreli lenfoma olarak ayrı bir kategoride toplanmıştır. Prognostik farklılıkları olan özel lokalizasyonlara ait lenfomalar, özel tip büyük B hücreli lenfoma kategorisi altında toplanmıştır. Yüksek dereceli veya özel tip lenfoma olarak sınıflandırılmayan diffüz büyük B hücreli lenfomalar, "DLBCL, NOS" olarak tanımlanmıştır. DLBCL, NOS kategorisi de kendi içinde heterojen bir grup olup, moleküler özelliklerine göre GEP analizi ve immünohistokimyasal (Hans) algoritmalarla GCB ve ABC alt tiplere ayrılmıştır. Böylece prognozu daha öngörülebilir hale getirmek amaçlanmıştır.

Bu çalışmada BCL2, BCL6, MYC gen translokasyonlarının FISH ile değerlendirilmesi sonucu "DLBCL, NOS" kategorisine alınan 45 olgu Hans algoritmasına göre GCB ve Non-GCB moleküler alt tiplere ayrılmıştır. BCL2, BCL6, MYC protein ekspresyonları ve bu genlerdeki FISH ile saptanan anormallikler ile double ekspresyon durumu da değerlendirilmiş ve aralarındaki ilişki araştırılmıştır. Ayrıca son yıllarda hedefe yönelik anti-CD30 tedavi seçeneğinin gündeme gelmesi nedeniyle, olgularda CD30 ekspresyonları da değerlendirilmiş, sıklığı ve prognostik önemi araştırılmıştır. Literatürde DLBCL üzerine yapılan çalışmalar genellikle yüksek dereceli B hücreli lenfoma ve özel tip büyük B hücreli lenfoma olgularını da içermektedir. Bizim olgu serimiz sadece DLBCL, NOS kategorisini içermektedir. Sadece DLBCL, NOS kategorisine yönelik yapılan çalışma sayısı azdır (94-100).

DLBCL, NOS her yaş grubunda görülebilmekle birlikte 7. dekatta ve erkek cinsiyette siktir (1). Smith ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı bir meta-analizde (101), Avrupa ülkelerinde yaş ortalaması genellikle 68 olarak saptanmıştır. Asya

ülkelerinde yapılan bazı epidemiyolojik çalışmalarda ise yaş ortalaması 50-55 arasında değişmektedir (102-104). Yapılan diğer bazı çalışmalarda da yaş dağılımları 59-63 yaşları arasındadır (36, 38, 67). Bizim çalışmamızda yaş ortalaması 59,2'dir, olguların %62,2'si erkek cinsiyettedir.

Diffüz büyük B hücreli lenfoma olgularının yaklaşık %40'ı primer ektranodal, %60'ı nodal başlangıçlıdır. Hastalık seyri sırasında nodal olguların %60-70'inde sekonder ektranodal tutulum eşlik etmektedir (10). Bizim çalışmamızda olguların %71,1'i nodal orjinli olup, bu olguların %42,2'sinde lenf nodu, %28,9'unda sekonder ektranodal tutulum bölgelerinde tanı konmuştur. Olguların %20'si primer ektranodaldır, %8,9 'u ise ektranodal lokalizasyonda ortaya çıkmış olup, ancak klinik takipleri olmadığından primer-sekonder ayrımı yapılamamıştır. Çalışmamızda primer ektranodal olgu oranının az olması, 2 yıllık vaka serisini içermesi yanısıra 2016 DSÖ lenfoma sınıflamasında ayrı kategorilerde yer alan özel lokalizasyonlara ait büyük B hücreli lenfomaların olgu serimizden dışlanmış olmasıdır. Çalışmamız sadece DLBCL, NOS kategorisi içerisinde yer alan primer ektranodal lenfomaları içermektedir. En sık ektranodal lokalizasyon gastrointestinal sistemdir (1, 3). Çalışmamızda olguların %22,2'si gastrointestinal sistemde lokalizedir. Gastrointestinal sistemde lokalize olguların %50'si primer, %30'u sekonder tutulum, %20'si ise takipsiz olgulardır. En sık lokalizasyon midedir. Çalışmamızda nodal-ektranodal kategori ile Ann-Arbor evre, IPI skoru ve LDH düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur. Primer ektranodal olguların çoğu (%88,8) Ann-Arbor evre 1'dir ($p<0,05$). Geri kalan olgular ise evre 4'tür ($p<0,05$). Ektranodal olguların LDH düzeyi ve IPI skoru nodal olgulara göre daha düşüktür ($p<0,05$). Çalışmamızda son iki yılda tanı alan olgular yer aldığından 5 yıllık survival analizi yapılamamıştır.

Moller ve ark. (105)'nin 2004 yılında yaptıkları 1575 DLBCL olgu serisi analizinde olguların %40'ını primer ektranodal kategori oluşturmaktadır. Bizim çalışmamıza benzer şekilde en sık ektranodal lokalizasyonun gastrointestinal sistem olduğu, ektranodal olguların LDH düzeyinin nodal olgulara göre daha düşük olduğu ve ektranodal olguların çoğunun Ann-Arbor evre 1 olduğu saptanmıştır. Ollila ve ark. (106)'nin 2018 yılında yaptıkları çalışmada da bizim çalışma sonucunuza benzer şekilde, primer ektranodal olgularda Ann-Arbor evresi düşük saptanmıştır.

Literatürde bazı çalışmalarda gastrointestinal sistem lokalizasyonlu olan olgularda prognozun daha iyi olduğu belirtilmiştir (38, 105-107).

DLBCL, NOS moleküler alt tipleri, ilk defa DSÖ 2016 lenfoma sınıflamasında yer almıştır. GEP analizine göre belirlenen GCB ve Non-GCB alt tiplerde prognoz, klinik, immünohistokimyasal ve moleküler özellikler arasında önemli farklılıklar mevcuttur. En sık görülen GCB (%60) tiptir (1). Bizim çalışmamızda olguların %33,3'ü GCB tipte olup, %66,7'si Non-GCB tiptedir. Gong ve ark. (38)'nin 2018 yılında yayınladıkları 241 de novo DLBCL olgusu içeren çalışmada da Hans algoritmasına göre, bizim çalışmamıza benzer şekilde olguların %36,9'u GCB tip, %63,1'i Non-GCB tiptedir.

Morfolojik tipler 3 ana kategoriye ayrılmaktadır. Bunlar sentroblastik, immünoblastik ve anaplastik tiplerdir. Bazı olgular nadir görülen morfolojik tiplerde olabilmekte ya da tespit bozukluğu veya hibrid görünüm nedeni ile sınıflandırmada zorluk yaşanabilmektedir. GCB tipte en sık sentroblastik morfolojinin görüldüğü belirtilmektedir. Sentroblastik tip, sentroblast benzeri hücre yoğunluğuna bağlı olarak ayrıca kendi içinde monomorfik ve polimorfik olarak ayrılmaktadır (1, 16). Bizim çalışmamızda %48,9'u monomorfik, %22,2'si polimorfik olmak üzere, olguların %71,1'i sentroblastik tiptedir. Olguların %8,9'u anaplastik tipte olup, %20'si ise nadir ya da sınıflandırılmayan kategoridedir. GCB ve ABC tip arasında morfolojik özellikler açısından istatistiksel farklılık gözlenmemiştir. De Paepe ve ark. (108) yaptıkları bir analizde genellikle GCB tipte sentroblastik monomorfik morfolojinin, ABC tipte ise sentroblastik polimorfik ve immünoblastik morfolojinin daha sık izlendiğini belirtmişlerdir.

BCL2, BCL6 ve MYC translokasyonları/yeniden düzenlenmeleri DLBCL, NOS olgularında prognoz açısından oldukça önemlidir. BCL2 translokasyonu GCB tipte daha sık olup, GCB tipte %40 sıklıkta, ABC tipte %5 sıklıktadır. BCL2 kopya sayısı artışı ise ABC tipte daha sık olup olguların %55'inde görülmektedir. GCB tipte ise BCL2 kopya sayısı artışı %15 civarındadır (1). Ennishi ve ark. (49)'nin 2017 yılında 347 DLBCL olgusu ile yaptıkları çalışmada, BCL2 translokasyonunu %30 oranında, BCL2 kopya sayısını %25 oranında saptanmış, BCL2 translokasyonu GCB tipte, BCL2 kopya sayısı artışı ABC tipte sık saptanmıştır. BCL2 translokasyonu veya kopya sayısı artışının yüksek LDH düzeyi ve kötü prognoz ile

ilişkili olduğu bildirilmektedir (49). Visco ve ark. (60)'nın 327 olgu ile yaptıkları çalışmada, BCL2 gen anormalliklerini daha az sıklıkta saptamış olup, olguların %18,3'ünde BCL2 translokasyonu, %15,3'ünde BCL2 kopya sayısı artışı olduğu belirtilmiştir. BCL2 translokasyonu yüksek Ann-Arbor evre ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur. GCB ve ABC moleküler tipleri arasında BCL2 translokasyon veya kopya sayısı artışının görülme sıklığı açısından bizim çalışmamızda olduğu gibi istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (60). Akay ve ark. (80)'nin 44 olgu ile yaptıkları çalışmada BCL2 translokasyonu %18,2 oranında saptanmıştır. BCL2 translokasyonu olan olgularda, BCL6 ve MYC translokasyonları olan olgular ile karşılaştırıldığında yaşam süresinin daha uzun olup, daha iyi prognozla ilişkili olduğu bildirilmektedir (80). Bizim çalışmamızda BCL2 translokasyonu olguların %6,7'sinde saptanmıştır. BCL2 kopya sayısı artışı ise olguların %31,1'inde mevcuttur. BCL2 translokasyon ve kopya sayısı artışı ile moleküler alt tipler, klinik, morfolojik özellikler, BCL2 ekspresyonu ve diğer immünohistokimyasal parametreler arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır.

DLBCL, NOS olgularında en sık genetik anormalliğe BCL6 geninde rastlanmaktadır. BCL6 translokasyonu ABC tipte %25-30 sıklıkta, BCL6 kopya sayısı artışı %45 sıklıkta gözlenmektedir. GCB tipte görülme sıklığı daha az olup, olguların %15'inde BCL6 translokasyonu, %15-20'sinde BCL6 kopya sayısı artışı görülmektedir (1). Copie-Bergman ve ark. (109)'nin 574 olgu ile yaptıkları çalışmada BCL6 translokasyon sıklığı %27,4 bulunmuştur. Valera ve ark. (110)'nin 219 olgu ile yaptıkları çalışmada BCL6 translokasyon oranı %28, kopya sayısı artışı oranını %15 saptanmıştır. Her iki çalışmada da tek başına BCL6 translokasyon veya kopya sayısı artışı ile kötü prognoz, yüksek evre, yüksek IPI skoru ve moleküler alt tip arasında ilişki saptanmamıştır (109, 110). Akay ve ark. (80)'nin çalışmasında ise BCL6 translokasyonu %63,6 oranında saptanmış olup, düşük survival ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur. Bizim çalışmamızda olguların %40'ında BCL6 translokasyonu, %17,8'inde BCL6 kopya sayısı artışı saptanmış olup, BCL6 translokasyon veya kopya sayısı artışı ile moleküler alt tip arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Diğer klinik, histopatolojik ve BCL6 ekspresyonu ve diğer immünohistokimyasal parametrelerle korelasyon saptanmamıştır.

MYC birçok genin fonksiyonunun düzenlenmesinde görev alan, B hücre farklılaşmasında rolü olan, onkojenik potansiyeli yüksek bir transkripsiyon faktörüdür. MYC translokasyonu, DLBCL, NOS olgularının %5-8'inde görülebilmektedir (1). MYC translokasyonuna ilaveten bazı olgularda MYC kopya sayısı artışı bulunabilmektedir. Literatürde MYC kopya sayısı artışının prognostik değeri konusunda ortak görüş olmayıp, son yıllardaki çalışmalar yaşam süresi üzerinde negatif etkili olduğunu göstermektedir. MYC kopya sayısı artışının negatif etkisinin MYC translokasyonuna göre daha az olduğu belirtilmektedir. Bizim çalışmamızda %11,1 olguda MYC translokasyonu, %22,2 olguda kopya sayısı artışı saptanmıştır. Çalışmamızda MYC translokasyonu veya kopya sayısı artışı olan olgularda Ann-Arbor evresi ve LDH düzeyi istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksektir ($p<0,05$). MYC genindeki bu anormalliklerin Ann-Arbor evre ve LDH düzeyi gibi prognozu kötü etkileyen faktörlerin yüksek olduğu olgularda saptanması, kötü prognostik faktör olduğunu desteklemektedir. Moleküler alt tipler arasında MYC gen anormallikleri açısından fark olmadığı belirtilmekte olup, çalışmamızda da fark saptanmamıştır (1).

Copie-Bergman ve ark. (109)'nın 2015 yılında 574 olguyu dahil ettikleri çalışmalarında MYC translokasyonu oranını %8,9 olarak bulmuşlardır. MYC translokasyonu, yüksek Ann-Arbor evresi, yüksek IPI skoru, yüksek ektranodal tutulum sayısı ve sık kemik iliği tutulumu arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmuştur (109). Ennishi ve ark. (49)'nın 2017 yılında 347 olgu ile yaptıkları çalışmada MYC translokasyon oranını bizim çalışmamıza benzer olarak %15, MYC kopya sayısı artışını %20 saptanmıştır. MYC translokasyon veya kopya sayısı artışı ileri yaş ve yüksek LDH düzeyi ile ilişkili bulunmuş, IPI skoru ile istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır. Valera ve ark. (110) ile Lu ve ark. (63)'nin çalışmalarında da MYC translokasyonu olan olgularda IPI skoru istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olup bizim çalışmamızda ise IPI skoru ile istatistiksel ilişki saptanmamıştır.

Çalışmamızda FISH ile saptanan BCL2, BCL6, MYC genetik anormalliklerinin birbiri ile ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. BCL2 kopya sayısı artışı olan olguların %85,7'sinde BCL6 translokasyon veya kopya sayısı artışı eşlik etmektedir ($p<0,05$). BCL2 kopya sayısı artışı olan olguların %55,6'sında MYC kopya sayısı artışı, BCL2 translokasyonu olan olguların tamamında ise MYC kopya

sayısı artışı veya monozomisi saptanmıştır ($p<0,05$). MYC kopya sayısı artışı olan olguların ise %90'ında BCL6 translokasyon veya kopya sayısı artışı saptanmıştır ($p<0,05$). En sık BCL2 ve BCL6 kopya sayısı artışında birliktelik (6 olgu) olup, ikinci olarak BCL2 ve MYC (5 olgu), en az BCL6 ve MYC (3 olgu) kopya sayısı artışı birlikteliği izlenmiştir. Ma ve ark. (66)'nın 127 olgu ile yaptıkları çalışmada MYC, BCL2, BCL6 genlerinin herhangi ikisinde birlikte kopya sayısı artışı olma durumu (%79) "Atipik Double Hit" olarak tanımlanmış ve survival analizlerinin Double Hit lenfomadan çok farklı olmadığı bildirilmiştir. Çalışmalarında çift kopya sayısı artışı görülen olguların %41'inde BCL2-MYC, %37'sinde BCL6-MYC kopya sayısı artışı birlikteliği izlenmiştir. Ennishi ve ark. (49)'nın çalışmasında MYC translokasyonu görülen olgularda BCL2 gen mutasyonlarının, BCL2 translokasyonu gözlenen olgularda MYC gen translokasyonlarının daha sık eşlik ettiği ve bu durumların kötü prognozla ilişkili olduğu saptanmıştır. Li ve ark. (64)'nin yaptığı diğer bir çalışmada BCL2 translokasyonu/ MYC kopya sayısı artışı, MYC translokasyonu/ BCL2 kopya sayısı artışı ve MYC/BCL2 kopya sayısı artışı olan olgular üç grup halinde incelenmiştir. Bu olguların 'Atipik Double Hit' olarak isimlendirilmesi önerilmiş ve yüksek dereceli lenfomalardan daha iyi, DLBCL, NOS olgularından daha kötü prognoza sahip olduğu bildirilmiştir (64).

DSÖ 2016 lenfoma sınıflamasından sonra MYC-BCL2, MYC-BCL6 ve her üçünün translokasyonunun birlikte görüldüğü durumlar yüksek dereceli B hücreli lenfoma olarak tanımlanmış, prognozunun daha kötü olduğu belirtilerek ayrı bir kategoriye alınmıştır. Ancak MYC, BCL2 translokasyonlarının tek başına görüldüğü olgular ile MYC, BCL2, BCL6 kopya sayısı artışının birlikte görüldüğü durumlar hala DLBCL, NOS kategorisinde yer almaktadır. Bu durumdaki olgular, DLBCL, NOS kategorisi içerisinde prognoz açısından heterojeniteye yol açmakta ve prognozun öngörülebilirliğini azaltmaktadır. Bu durumların diğer DLBCL, NOS olguları ile karşılaştırıldığında çok daha düşük survival ve kötü prognoza sahip olduğunu saptayan çok sayıda çalışma mevcuttur (49, 60, 63, 64, 66, 109, 110). MYC, BCL2 ve BCL6 kopya sayısı artışının birbirleri ile ilişkisi ve korelasyonu konusunda az sayıda çalışma vardır (49, 66). DLBCL, NOS olgularındaki bu genetik varyasyonların bilinmesi prognoz tayini açısından önemlidir. MYC, BCL2, BCL6

kopya sayısı artışı birlikteliğinin nedenleri ve sıklığı konusunda daha çok çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

BCL2 apoptozun düzenlenmesinde görev alan çok önemli bir proteindir. Diffüz büyük B hücreli lenfomada %47-84 sıklıkta ekspresyonu gözlenebilmektedir. Bazı çalışmalarda BCL2'nin "clone 124", "clone E17", SP66 klonları arasında ekspresyon oranları arasında farklılıklar olduğu bildirilmiştir (26, 30). Bizim çalışmamızda SP66 ile olguların %75,6'sında pozitiflik saptanmış olup "clone 124" ile %71,1'inde pozitiflik mevcuttur. İki klon arasındaki bu %4,5'lik ekspresyon farkı istatistiksel anlamda önemli bir farklılık yaratmamıştır.

Kendrick ve ark. (26)'nın çalışmasında BCL2 SP66 ekspresyonun, FISH ile tespit edilen BCL2 translokasyonu ile korele olduğu belirtilmektedir. Bazı çalışmalarda da benzer şekilde korelasyon mevcuttur (27, 111). Bizim çalışmamızda SP66 veya "clone 124" ile BCL2 translokasyonu veya kopya sayısı artışı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. BCL2 ekspresyonunun genellikle translokasyonu ile ilişkili gözlendiği belirtilmektedir. Bazı çalışmalarda aktive B hücreli moleküler tipte de BCL2 ekspresyonunun farklı mekanizmalarla sık gözlenebileceği öne sürülmektedir (20, 21).

Çalışmamızda BCL2 ekspresyonunun "clone 124" ve SP66 klonları ile GCB ve ABC tipte sıklığı araştırılmıştır. Non-GCB (ABC) tipteki olgularda her iki klonla da daha sık eksprese olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). SP66 klonu ile Non-GCB (ABC) tipteki olguların %93,3'ünde BCL2 pozitif saptanmıştır. GCB tip olgularda ise ekspresyon oranı %40'tır. Bununla bağlantılı olarak Hans algoritmasında ABC tip sınıflamasında kullanılan MUM1 pozitif olgularda SP66 ile BCL2 ekspresyonu sık gözlenirken ($p<0,05$), GCB tip tayininde kullanılan CD10 pozitif vakalarda BCL2 ekspresyonu nadirdir ($p<0,05$).

Iqbal ve ark. (23)'nin çalışmasında, GCB tipte BCL2 ekspresyonunun BCL2 translokasyonu ile büyük ölçüde korelasyon gösterdiği belirtilmektedir. Yani esas olarak BCL2 translokasyonunun BCL2 ekspresyonunu sağladığı yönünde düşünülmektedir. Ancak BCL2 ekspresyonunun, translokasyon sık olmamasına rağmen ABC tipte de sık görüldüğü gözlenmektedir. Bu durumun ABC tipte sık görülen BCL2 kopya sayısı artışı ve NF κ B yolunun aktivasyonunun, farklı bir yolak üzerinden BCL2 ekspresyonunu arttırması nedeni olduğu öne sürülmektedir (23).

Hu ve ark. (112), Muris ve ark. (113), Ichiki ve ark. (114)'nın çalışmalarında da ABC tipe, GCB tipe göre BCL2 ekspresyonunun daha yüksek olduğu belirtilmektedir. Bizim çalışmamızda da BCL2 ekspresyonu ABC tip olgularda siktir. BCL2 translokasyonu ile BCL2 ekspresyonu arasında ilişki bulunmamıştır.

Çalışmamızda BCL2 ekspresyonu ile nodal-ekstranodal kategori arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). Nodal olguların %84'ünde BCL2 pozitifliği izlenirken, primer ekstranodal olguların %33,3'ünde BCL2 pozitifliği gözlenmiştir. Nodal orjinli olgularda BCL2 ekspresyonu siktir. Gutierrez-Garcia ve ark. (107)'nin 262 DLBCL, NOS olgusunda yaptıkları çalışmada ise BCL2 ekspresyonu açısından, nodal ve ekstranodal olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (107). Al-Humood ve ark. (115) 45 olgu ile yaptıkları bir çalışmada ise nodal olguların %65,3'ünde, primer ekstranodal olguların %47,1'inde BCL2 pozitifliği bildirilmektedir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde nodal olgularda BCL2 ekspresyonu ve BCL2 kopya sayısı artışının, primer ekstranodal olgulara göre daha sık gözlendiği belirtilmiştir (115). Bu duruma nodal olgularda BCL2 kopya sayısı artışının daha sık gözlenmesinin neden olduğu öne sürülmüştür (115). Ancak bizim çalışmamızda nodal olgularda BCL2 ekspresyon sıklığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup BCL2 kopya sayısı artışı ile nodal-ekstranodal kategori arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır. Nodal ve primer ekstranodal olgularda, tam olarak bilgi sahibi olunmayan organ spesifik lenfomagenez faktörlerinin, BCL2 ekspresyonunda böyle bir farklılığa neden olabileceği öne sürülmüştür (115).

Çalışmamızda BCL2 ekspresyonu ile klinik parametreler arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. BCL2 ekspresyonu ile Ann-Arbor evre arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gözlenmiştir ($p<0,05$). Evre 4 olguların tamamında her iki klonla da BCL2 ekspresyonu mevcuttur. Ayrıca BCL2 pozitif olguların %80'i Ann-Arbor evre 3 ve 4'tür. BCL2 ekspresyonu yüksek evre ile ilişkilidir. Ancak BCL2 ekspresyonu ile yüksek evre ya da kötü prognoz arasında ilişki saptanmayan çalışmalar da mevcuttur (116, 117). Colomo ve ark. (118)'nin çalışmasında, bizim çalışmamıza benzer olarak, BCL2 ekspresyonu olan olgularda yüksek Ann-Arbor evresi, yüksek ve yüksek-orta IPI skoru ve düşük survival saptanmıştır. Kramer ve ark. (119)'nın da çalışmalarında BCL2 ekspresyonunun kısa yaşam süresi ile ilişkili olduğu saptanmış

, ancak Ann-Arbor evre ile korelasyon saptanmamıştır. Her iki çalışmada da BCL2 ekspresyonu ile BCL2 translokasyonu arasında korelasyon yoktur (118, 119).

CMYC protein ekspresyonunun germinal merkezde B hücre farklılaşmasının erken evrelerinde rolü büyüktür (8). Diffüz büyük B hücreli lenfomada %30 sıklıkta ekspresyonu gözlenebilmektedir (1). Zhang ve ark. (27), Johnson ve ark. (116)'nın çalışmalarında CMYC ekspresyonu ile translokasyonun korele olduğu saptanmıştır. Hu ve ark. (112)'nin 466 DLBCL olgusu ile yaptıkları çalışmada ve Green ve ark. (120)'nin çalışmasında CMYC ekspresyon oranı %54-64 saptanmış olup translokasyonu ile korelasyon saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda olguların %46,7'sinde CMYC pozitifdir. CMYC ekspresyonu ile translokasyon veya kopya sayısı artışı arasında korelasyon saptanmamıştır.

Çalışmamızda CMYC protein ekspresyonunun moleküler alt tipler ve diğer immünohistokimyasal belirleyiciler ile ilişkisi değerlendirilmiştir. CMYC protein ekspresyonu ile yaptığımız istatistiksel analizlerde CD10 ile ters korelasyon saptanmıştır ($p < 0,05$). CMYC pozitif olguların %95,2'sinde CD10 negatiftir. Moleküler alt tiplerle arasında istatistiksel ilişki bulunmamıştır.

Hu ve ark. (112) ile Lu ve ark.(121)'nin DLBCL vakaları ile yaptıkları çalışmalarda, CMYC ekspresyonu ABC tipte daha sık gözlenmiş, kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. CD10 ile istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Cutrona ve ark. (122)'nin ALL vakaları ile yaptıkları çalışmada ise CD10 pozitif vakalarda, sıklıkla CMYC ekspresyonu gözlenmemiştir. CD10'un hücre siklusunu düzenleyici ve apoptozu arttırıcı etkisinin olduğu ve bu vakalarda CMYC'i kodlayan genin ikinci ekzonuna spesifik inhibe edici bir peptid üretimi olduğu düşünülmektedir. Bai ve ark. (123) da DLBCL vakaları ile yaptıkları çalışmada CD10'un apoptozu arttırıcı ve düzenleyici etkisini doğrulamaktadır. İlginç olarak Burkitt lenfomada ise CD10 ve CMYC koekspresyonu tanı kriteri olarak kabul edilir. Burkitt lenfoma patogenezindeki farklılıklar böyle bir sonucu ortaya çıkarıyor olabilir. Bu açıdan bakınca DLBCL, NOS olgularında ise tam tersi olarak CD10 ve CMYC koekspresyonunun çok daha nadir görülmesi doğaldır.

CMYC ve BCL2 ekspresyonunun birlikte görüldüğü olgular "Double expressor lenfoma" olarak adlandırılmaktadır. Double ekspresyonun Non-GCB tipte daha sık olduğu belirtilmektedir (1, 16). Çalışmamızda double ekspresyon DLBCL,

NOS olgularının 16 (%35,5)'sında gözlenmiştir. Bu olguların %93,7'si Non-GCB tiptedir ($p<0,05$). Moleküler alt tip açısından bakıldığında, çalışmamızda Non-GCB tip olguların %50'sinde double ekspresyon gözlenirken, GCB tipte bu oran sadece %6,6'dır. Hu ve ark. (112), 411 olgu ile yaptıkları çalışmada; BCL2 ekspresyonunu ABC tipte %61, GCB tipte %40, CMYC protein ekspresyonunu ABC tipte %72, GCB tipte %57 ve double ekspresyonu ABC tipte %46, GCB tipte %22 bulmuşlardır. Perry ve ark. (124)'nin çalışmasında ise GCB tipte double ekspresyon daha sık saptanmıştır. Her iki çalışmada da double ekspresyon kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise IPI skoru, Ann-Arbor evre, LDH düzeyi gibi parametrelerle istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Vakaların son iki yıla ait olması nedeniyle, 5 yıllık survival açısından değerlendirme yapılamamıştır.

Ki-67 proliferasyon indeksi kaynaklara göre DLBCL, NOS olgularında değişken olmakla birlikte genellikle %40'ın üzerindedir. Ki-67 proliferasyon indeksinin prognozu göstermede çok güvenilir bir faktör olmadığı bilinmektedir. Bizim çalışmamızda Ki-67 proliferasyon indeksi %40-%100 arasında değişmektedir. Ortalama %76,2'dir. Çalışmamızda Ki-67 proliferasyon indeksi ile klinik, immünohistokimyasal ve moleküler özellikler arasındaki ilişki incelenmiştir. Ki-67 ile yapılan istatistiksel analizlerde sadece CD30 (%10 eşik değer) pozitif olgularda Ki-67 proliferasyon indeksi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır ($p<0,05$). Bununla ilgili çalışma sonuçlarından daha sonra CD30 tartışılırken bahsedilecektir. Ki-67 proliferasyon indeksi ile Ann-Arbor evre, IPI skoru, LDH düzeyi gibi prognoz göstergesi olan klinik faktörlerle ilişki saptanmamıştır. Çalışmamızda double ekspresyon, MYC veya BCL2 translokasyonu gibi kötü prognostik faktörlerle Ki-67 proliferasyon indeksi arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Zhang ve ark. (27)'nin çalışmasında ise MYC translokasyonu görülen olgularda Ki-67 proliferasyon indeksi, diğer olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır.

Çalışmamızda CD30 ekspresyon sıklığı ve klinik, immünohistokimyasal ve moleküler prognostik faktörlerle ilişkisi araştırılmıştır. CD30 "tumour necrosis factor receptor (TNFR) superfamily" ailesinin bir üyesidir. EBV negatif DLBCL olgularının yaklaşık %10-20'sinde eksprese olabilmektedir. DLBCL'de CD30 ekspresyonunun prognostik önemi ve pozitif kabul etmek için boyanmanın eşik

değeri konusunda kesin bir görüş yoktur. Bizim çalışmamızda %1 ve %10 eşik değerlerine göre ayrı ayrı değerlendirme yapılmıştır. Olguların %1 eşik değerine göre %24,4'ünde, %10 eşik değerine göre %17,7'sinde CD30 ekspresyonu mevcuttur. Moleküler alt tiplere göre CD30 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak fark yoktur. Hu ve ark. (40) 'nın 461 olguyu dahil ettikleri bir çalışmada %20 eşik değerine göre olguların %14'ünde CD30 pozitifliği saptanmıştır. GCB tipte CD30 ekspresyonunu, ABC tipe göre daha sık izlenmiştir. Ayrıca CD30 pozitif olgularda; BCL2 ve MYC double ekspresyonun daha az görüldüğü, MYC translokasyonu veya kopya sayısı artışının bulunmadığı bildirilmiştir. CD30 ekspresyonu gözlenen olgularda prognozun çok daha iyi olduğu belirtilmiştir. Bunun nedeni hala tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte, antiproliferatif etkilerinden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. CD30'un, FAS ligandı etkileyerek ekstrensek yoldan apoptozu tetiklediği, özellikle ABC tip lenfomaların patogenezinde ana faktör olan NFκB yolağını inaktive ettiği ve B hücre sinyal reseptörlerini downregüle ettiği düşünülmektedir (40). Bir diğer çalışmada >%0 eşik değerine göre olguların %9,9'unda CD30 ekspresyonu saptanmış olup, her iki çalışmada da CD30 pozitif olgularda MYC translokasyonu saptanmamıştır (38, 42). Bizim çalışmamızda CD30 (%1 eşik değer) pozitif olgularda genellikle MYC translokasyonu veya kopya sayısı artışı saptanmamıştır. MYC direkt etkili bir transkripsiyon faktörüdür ve B hücre farklılaşmasında da rolü vardır (8). CD30'un ise transkripsiyonu sağlayan NFκB yolağının aktivasyonunu önleyerek, indirekt olarak transkripsiyonu inhibe ettiği düşünülmektedir. Literatürde CD30 ile MYC arasındaki ilişki açıklanabilmiş değildir. Çalışmamızda MYC protein ekspresyonu ile CD30 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Çalışmamızda CD30 ile BCL2, BCL6 ekspresyonları ve Ki-67 proliferasyon indeksi arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. CD30 ekspresyonu (%10 eşik değerine göre) ile Ki-67 proliferasyon indeksi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p < 0,05$). CD30'un antiproliferatif etkileri olduğu düşünüldüğünde Ki-67 proliferasyon indeksi düşük beklenirken CD30 pozitif olgularımızda Ki-67 proliferasyon indeksi daha yüksek saptanmıştır ($p < 0,05$). Gong ve ark. (38) ile Hao ve ark. (41)'nin çalışmasında da çalışmamıza benzer olarak, Ki-67 proliferasyon indeksi CD30 pozitif olgularda daha yüksektir. Bir diğer çalışmada Ki-67

proliferasyon indeksi düşük saptanmıştır (40). CD30 pozitif olgularda Ki-67 proliferasyon indeksinin değişken saptanmasına, DLBCL'nin heterojen bir hastalık olması, olgularda Ki-67 proliferasyon indeksini etkileyebilecek saptanamayan ek özellikler bulunması neden olmuş olabilir.

Çalışmamızda CD30 (%1 eşik değerine göre) ile BCL6 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuş, CD30 pozitif olgularda BCL6 ekspresyonu daha nadir gözlenmiştir ($p < 0,05$). Hu ve ark. (40) çalışmalarında CD30 pozitif olgularda BCL6 translokasyon veya kopya sayısı değişikliklerinin daha nadir olduğu belirtilmiş, BCL6 ekspresyonu ise CD30 negatif ve pozitif grupta eşit oranda bulunmuştur (40). Bazı çalışmalarda da CD30 pozitif ve negatif olgular arasında BCL6 ekspresyonu açısından ise fark gözlenmemiştir (38, 41). Bahsedilen çalışmada diğer çalışmaların tersine, CD30'un NF κ B ve MAPK yollarını aktive ettiğini, kötü prognostik faktör olduğu savunulmaktadır (41). Bizim çalışmamızda Ann-Arbor evre ve IPI skoru gibi klinik prognostik göstergelerle CD30 arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Bu konuda daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Daha ileri spesifikite edilemeyen DLBCL olguları, çalışmamızda da gözlendiği gibi heterojen özelliklere sahip olup, prognoz hakkında bilgi sağlayıcı morfolojik değerlendirmeler, immünofenotipik ve sitogenetik analizler, kopya sayısı artışı ve gen mutasyonlarının değerlendirildiği moleküler tanısal tetkiklerinin yapılmasını gerektirmektedir. Bu kategoride olan vakalarda literatürde BCL2, BCL6, MYC gen kopya sayısı artışının prognostik önemi konusunda az sayıda çalışma mevcut olup, yaşam süresi ile ilişkilendiren çalışmalar katkı sağlayıcı olacaktır. Bu olgu serimizi daha ileriki yıllarda olguların sayısını arttırarak 5 yıllık survival analizi ile değerlendirmeyi amaçlamaktayız.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmaya Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2018-2020 yılları arasında diffüz büyük B hücreli lenfoma tanısı almış 45 olgu dahil edilmiştir. Yüksek dereceli B hücreli lenfoma ve özel tip büyük B hücreli lenfoma olguları çalışmadan dışlanmış olup, olguların tümü DLBCL, NOS kategorisindedir.
2. Olguların yaşları 19-82 arasında değişmektedir, yaş ortalaması 59,2'dir.
3. Olguların 17 (%37,8)'si kadın, 28 (%62,2)'i erkek cinsiyettedir.
4. Olguların çoğu nodal orjinli (%71,1) olup, bunların 19 (%42,2)'u nodal lokalizasyonlu, 13 (%28,9)'ü sekonder ektranodal lokalizasyonudur.
5. Primer ektranodal olguların sayısı 9 (%20) olup, sadece DLBCL, NOS kategorisindeki primer ektranodal olguları içermektedir. Özel ektranodal lokalizasyonlar (SSS, mediastinal, leg type), özel tip büyük B hücreli lenfoma içerisinde değerlendirilerek, olgu serimizden dışlanmıştır.
6. Olguların 4'ü ektranodal lokalizasyonlu olup klinik takibi olmadığından, primer-sekonder ayrımı yapılamamıştır. Bu olguların 2'si mide, 1'i tonsil, 1'i periton lokalizasyonludur.
7. Çalışmamızdaki primer ektranodal olguların 4'ü mide lokalizasyonlu olup, dalak, duodenum, serviks, testis, tonsil lokalizasyonlu birer olgu mevcuttur.
8. Sekonder ektranodal olguların 4'ü cilt, 3'ü tonsil, 2'si kolon, 1'i mide, 1'i adrenal, 1'i karaciğer, 1'i kemik iliği lokalizasyonludur.
9. Hans algoritmasına göre olguların 15 (%33,3)'ü GCB, 30 (%66,7)'si Non-GCB tiptedir.
10. Olguların 22 (%48,9)'si sentroblastik monomorfik, 10 (%22,2)'si sentroblastik polimorfik, 4 (%8,9) olgu anaplastik tiptedir. Olgulardan 9 (%20)'u sınıflandırılmamıştır, immünohistokimyasal tipte olgu gözlenmemiştir.
11. Çalışmamıza dahil edilen 45 olgunun, 9'unun klinik takibi olmadığından Ann-Arbor evre, LDH düzeyi, ektranodal tutulum sayısı ve ECOG verilerine ulaşılamamış olup, IPI skoru hesaplanamamıştır. Klinik verilerine ulaşılabilen

- 36 olgunun 9 (%20)'u Ann-Arbor evre 1, 6 (%13,3)'sı Ann-Arbor evre 2, 14 (%31,1)'ü Ann-Arbor evre 3, 7 (%15,6)'si Ann-Arbor evre 4'tür.
12. Laboratuvar verilerine ulaşılabilen 36 hastadan 12 (%26,7)'sinin LDH düzeyi düşük, 24 (%53,3)'ünün LDH düzeyi yüksektir.
13. 36 olgunun ektranodal tutulum sayısı değerlendirilebilmiş olup 0-4 arasında değişmektedir.
14. 36 olgudan 33 (%73,3)'ünün ECOG skoru 1, 3 (%6,7)'ünün ECOG skoru 2'dir.
15. Yaş, Ann-Arbor evre, LDH düzeyi, ECOG, Ektranodal tutulum sayısı parametrelerine göre 36 olgunun IPI skoru hesaplanmıştır. 36 olgudan 9 (%20)'u IPI skoruna göre düşük risk, 9 (%20)'u düşük-orta risk, 12 (%26,7)'si yüksek-orta risk, 6 (%13,3)'sı yüksek risk kategorisindedir.
16. İmmünohistokimyasal incelemede olguların 9 (%20)'u CD10 pozitif, 32 (%71,1)'i MUM1 pozitifdir.
17. Olguların 39 (86,7)'sinde BCL6 ekspresyonu ve FISH ile 18 (%40)'ında BCL6 translokasyonu, 8 (%17,8)'inde BCL6 kopya sayısı artışı, 4 (%8,9)'unda BCL6 monozomisi saptanmıştır. BCL6 ekspresyonu ile BCL6 translokasyon veya kopya sayısı artışı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur.
18. Olguların SP66 ile 34 (%75,6)'ünde, "clone 124" ile 32 (%71,1)'inde BCL2 ekspresyonu saptanmıştır. FISH ile olguların 3 (%6,7)'ünde BCL2 translokasyonu, 14 (%31,1)'inde BCL2 kopya sayısı artışı, 4 (%8,9)'unda BCL2 monozomisi saptanmıştır. BCL2 ekspresyonu ile BCL2 translokasyon veya kopya sayısı artışı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur.
19. CMYC protein ekspresyonu olguların 21 (%46,7)'inde saptanmıştır. FISH ile olguların 5 (%11,1)'inde MYC translokasyonu, 10 (%22,2)'unda MYC kopya sayısı artışı, 5 (%11,1)'inde MYC monozomisi gözlenmiştir. CMYC protein ekspresyonu ile MYC translokasyonu veya kopya sayısı artışı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.
20. Olguların Ki-67 proliferasyon indeksleri %40-%100 arasında değişmekte olup, ortalama %76,2'dir. Olguların %40'ı, %90 ve üzeri Ki-67 proliferasyon indeksine sahiptir.

21. CD30 immünohistokimyasal belirleyicisi ile %1 eşik değerine göre olguların 11 (%24,4)'ü pozitifdir. Olguların ekspresyon oranları %1-%70 arasında değişmektedir. %10 eşik değerine göre ise 8 (%17,7) olgu pozitifdir.
22. Yapılan istatistiksel analizlerde CD30 ile tüm klinik, histopatolojik ve moleküler parametreler arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. CD30 ekspresyonu (%10 eşik değerine göre) ile Ki-67 (%90 eşik değerine göre) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0,045$). Ayrıca CD30 (%10 eşik değerine göre) pozitif olguların %75'inde, Ki-67 proliferasyon indeksi (%90 eşik değerine göre) yüksektir.
23. CD30 (%1 eşik değer) pozitifliği ile BCL6 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,025$). BCL6 negatif 6 olgunun 4 (%66,6)'ü CD30 (%1 eşik değer) pozitifdir. BCL6 pozitif 39 olgunun ise 7 (%17,9)'si CD30 (%1 eşik değer) pozitifdir. BCL6 ekspresyonu ile CD30 (%1 eşik değer) arasında ters ilişki vardır.
24. İstatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmasa da analizlerde CD30 (%1 eşik değer) pozitif çoğu olguda, MYC translokasyonu veya kopya sayısı artışı görülmemiştir ($p>0,05$).
25. Nodal orjinli olgularda (nodal ve sekonder ektranodal) her iki klonla da BCL2 ekspresyonu, primer ektranodal olgulara göre daha sıktır ($p=0,003$). Nodal olguların %84'ünde BCL2 pozitifliği gözlenirken, primer ektranodal olguların %33,3'ünde BCL2 pozitifliği mevcuttur.
26. Primer ektranodal olgularda, nodal ve sekonder ektranodal olgulara göre daha düşük evre, LDH düzeyi ve IPI skoru izlenmiştir (sırasıyla p değerleri: 0,000; 0,002; 0,000).
27. Morfolojik tip ile klinik, immünohistokimyasal, moleküler ve diğer histopatolojik bulgular istatistiksel analiz ile karşılaştırılmış, anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).
28. Moleküler alt tip ile BCL2'nin her iki klonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur. Non-GCB tipte BCL2 ekspresyonu daha sık gözlenmiştir. "SP66" klonu ile 30 Non-GCB tipte olgunun 28 (%93,3)'inde BCL2 pozitifliği izlenmiş olup, 15 GCB tipte olgunun sadece 6 (%40)'sında pozitiflik mevcuttur ($p=0,000$).

29. Moleküler alt tip ile ‘‘Double ekspresör (CMYC ve BCL2)’’ arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0,004$). ‘‘Double ekspresör’’ kategorisindeki 16 olgunun 15 (%93,7)’i Non-GCB alt tiptedir.
30. BCL2 ekspresyonu ile Ann-Arbor evre arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır. BCL2 SP66 ile evre 4 gruptaki 7 olgunun 7 (%100)’sinde pozitiflik gözlenirken, evre 1 gruptaki 9 olgunun 3 (%33,3)’ünde pozitiflik izlenmiştir ($p=0,005$). Yüksek evre olgularda BCL2 ekspresyonunun her iki klonla da daha sık olduğu gözlenmiştir.
31. BCL2’nin her iki klonu ile Hans algoritmasında Non-GCB tip tayininde kullanılan MUM1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır. SP66 ile MUM1 pozitif 32 olgunun 29 (%90,6)’unda BCL2 pozitifliği mevcuttur ($p=0,001$).
32. BCL2, SP66 ile CD10 ekspresyonu arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulunmuştur ($p=0,028$). Hans algoritmasında GCB tip sınıflamasında kullanılan CD10 ekspresyonu olan olgularda, BCL2 ekspresyon sıklığı azdır. CD10 negatif olguların %83,3’ünde BCL2 pozitifliği izlenmiş olup, CD10 pozitif olguların sadece %44,4’ünde BCL2 pozitifliği mevcuttur.
33. CMYC protein ekspresyonu ile tüm klinik, histopatolojik, immünohistokimyasal ve moleküler bulgular karşılaştırılmış, sadece CD10 ekspresyonu ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0,025$). CMYC pozitif 21 olgunun 20 (%95,2)’sinde CD10 negatiftir.
34. Moleküler çalışmalarda; FISH ile BCL6 analiz sonuçları ile FISH ile BCL2 analiz sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gözlenmiştir ($p=0,001$). BCL6 polizomisi olan olguların %80’inde BCL2 polizomisi de eşlik etmektedir. BCL2 kopya sayısı artışı olan 14 olgunun 12 (%85,7)’sinde BCL6 kopya sayısı artışı veya translokasyonu eşlik etmektedir. BCL6 kopya sayısı artışı olan 8 olgunun 6 (%75)’sinde BCL2 kopya sayısı artışı veya translokasyonu eşlik etmektedir. BCL6 translokasyon veya kopya sayısı artışının, BCL2 translokasyon veya kopya sayısı artışı ile sıklıkla birliktelik gösterdiği izlenmektedir.

35. BCL6 ve MYC FISH analiz sonuçları arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,01$). MYC polizomisi olan 10 olgunun 9 (%90)'unda BCL6 translokasyon veya kopya sayısı artışı eşlik etmektedir.
36. BCL2 ve MYC FISH analiz sonuçları arasında da istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0,001$). BCL2 translokasyonu olan 3 olgunun 2 (%66,6)'sinde MYC monozomisi, 1 (%33,4)'inde MYC polizomisi eşlik etmektedir. BCL2 polizomisi olan 9 olgunun 5 (%55,6)'inde MYC polizomisi eşlik etmektedir.
37. BCL2 ve BCL6 kopya sayısı artışında birliktelik 6 vakada mevcut olup, 4 olguda her iki gende polizomi, 2 olguda trizomi görülmüştür. Ayrıca 2 olguda, BCL2 ve BCL6 genlerinin her ikisinde monozomi saptanmıştır.
38. MYC ve BCL6 kopya sayısı artışında birliktelik 3 vakada mevcut olup, her iki gende polizomi izlenmiştir. Ayrıca 2 olguda, MYC ve BCL6 genlerinin her ikisinde monozomi saptanmıştır.
39. MYC ve BCL2 kopya sayısı artışında birliktelik 5 vakada mevcut olup, her iki gende polizomi izlenmiştir. Ayrıca 2 olguda, MYC ve BCL2 genlerinin her ikisinde monozomi saptanmıştır.
40. Moleküler tipler arasında BCL2, BCL6, MYC translokasyon ve kopya sayısı artışı görülme sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$).
41. MYC translokasyon veya kopya sayısı artışı ile Ann-Arbor evre arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmıştır. Ann-Arbor evre 4 olan 7 olgunun 5 (%71)'inde MYC translokasyonu veya kopya sayısı artışı mevcuttur ($p=0,044$). Evre 1 gruptaki 9 olgunun ise 2 (%22)'sinde MYC translokasyon veya kopya sayısı artışı mevcuttur. MYC translokasyon veya kopya sayısı artışının yüksek evre ile korele olduğu saptanmıştır.
42. MYC translokasyon veya kopya sayısı artışı ile LDH düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki mevcuttur ($p=0,031$). MYC translokasyon veya kopya sayısı artışı olan 12 olgunun 11 (%91)'inde LDH düzeyi yüksek saptanmıştır.

43. BCL2, BCL6 ve MYC gen anormallikleri ile IPI skoru, Ki-67 proliferasyon indeksi ve diğer parametrelerle istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).
44. Sonuç olarak; DLBCL, NOS kategorisi heterojen bir hastalık grubudur. Hastalar açısından prognostik farklılığa neden olabilecek faktörlerin bilinmesi önemlidir. Çalışmamızda 45 DLBCL, NOS olgusunda moleküler alt tipler belirlenerek, BCL6, BCL2, CMYC protein, CD30 ekspresyonları ve FISH analizi ile saptanan BCL6, BCL2, MYC gen anormallikleri değerlendirilmiştir. İmmünohistokimyasal yöntemle belirlenen protein ekspresyonları ile FISH ile saptanan gen anormallikleri arasında korelasyon saptanmamıştır ($p>0,05$). Moleküler alt tiplerden Non-GCB tipte BCL2 ekspresyonu ve BCL2-CMYC double ekspresyonu daha sık saptanmıştır ($p<0,05$). Prognoza etkisi hala kesin olarak bilinmeyen CD30 ekspresyonunun görüldüğü olgularda, MYC translokasyon ve kopya sayısı artışı nadirdir ($p>0,05$). MYC gen anormallikleri çalışmamızda da literatür ile benzer şekilde yüksek evre ve LDH düzeyi ile korelasyon gösterdiğinden kötü prognostik faktörlerdendir ($p<0,05$). CD30'un MYC gen anormallikleri ile birlikte görülmemesi, CD30 ekspresyonunun iyi prognozla ilişkili olduğunu düşündürmüştür. Çalışmamızda BCL2, BCL6, MYC gen anormalliklerinin sıklıkla birliktelik gösterdiği saptanmıştır ($p<0,05$). Bu durumun prognoz üzerine muhtemel kötü etkisi, bu birlikteliğin sıklığı ve nedenleri konusunda daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Olgularda CD30 ekspresyon durumu, double ekspresyon durumu, BCL6, BCL2, MYC kopya sayısı artışlarının günlük pratikte analiz edilmesi ve bilinmesinin DLBCL, NOS olgularında prognozun öngörülebilirliğini arttıracığı düşünülmektedir. Ayrıca CD30 ekspresyonu durumunda hedefe yönelik tedavi seçeneği ve kötü prognoz gösteren hastalarda agresif tedavi seçenekleri mevcut olduğundan, bu gibi prognostik faktörlerin bilinmesi tedavinin şekillenmesine fayda sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Gascoyne RD, et al. Mature B-cell neoplasmas. Swerdlow SH, et al. eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC; 2017; pp 291–320. (Textbook).
2. Mills S. Histology for pathologists: Lippincott Williams & Wilkins; 2019.
3. Orazi A, Foucar K, Knowles D, Weiss LM. Knowles neoplastic hematopathology: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
4. Kuzu I. Lenfoid Sisteme Giriş ve Lenfoid Organlar.
5. Ruddle NH, Akirav EM. Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response. *The Journal of Immunology*. 2009;183(4):2205-12.
6. Markgraf R, von Gaudecker B, Müller-Hermelink HK. The development of the human lymph node. *Cell and tissue research*. 1982;225(2):387-413.
7. Rosai J. Rosai and Ackerman's surgical pathology e-book: Elsevier Health Sciences; 2011.
8. Jaffe ES, Harris NL, Vardiman J, Arber DA, Campo E. Hematopathology e-book: Elsevier Health Sciences; 2010.
9. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD, Project N-HsLC. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: Distributions of the major subtypes differ by geographic locations. *Annals of oncology*. 1998;9(7):717-20.
10. Project. NC. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997;89(11):3909-18.
11. Cömert M, Güneş AE, Saydam G. Diffüz büyük b-hücreli lenfoma. *Türkiye Klinikleri Hematoloji-Özel Konular*. 2012;5(3):35-42.
12. Das J, Ray S, Sen S, Chandy M. Extranodal involvement in lymphoma—A Pictorial Essay and Retrospective Analysis of 281 PET/CT studies. *Asia Oceania Journal of Nuclear Medicine and Biology*. 2014;2(1):42.
13. Kahraman DS, Diniz G, Ceylan C. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomalı Hastaların Klinikopatolojik ve İmmünofenotipik Özelliklerinin Prognostik Önemi.
14. Engelhard M, Brittinger Gn, Huhn D, Gerhartz HH, Meusers P, Siegert W, et al. Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 1997;89(7):2291-7.

15. Project N-HsLC. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 1997;89(11):3909-18.
16. Li S, Young KH, Medeiros LJ. Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology*. 2018;50(1):74-87.
17. 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. *New England Journal of Medicine*. 2002;346(25):1937-47.
18. Ott G, Ziepert M, Klapper W, Horn H, Szczepanowski M, Bernd H-W, et al. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2010;116(23):4916-25.
19. Haralambieva E, Pulford KA, Lamant L, Pileri S, Roncador G, Gatter KC, et al. Anaplastic large-cell lymphomas of B-cell phenotype are anaplastic lymphoma kinase (ALK) negative and belong to the spectrum of diffuse large B-cell lymphomas. *British journal of haematology*. 2000;109(3):584-91.
20. Berglund M, Thunberg U, Amini R-M, Book M, Roos G, Erlanson M, et al. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. *Modern pathology*. 2005;18(8):1113-20.
21. Höller S, Horn H, Lohr A, Mäder U, Katzenberger T, Kalla J, et al. A cytomorphological and immunohistochemical profile of aggressive B-cell lymphoma: high clinical impact of a cumulative immunohistochemical outcome predictor score. *Journal of hematopathology*. 2009;2(4):187-94.
22. Xu Y, McKenna RW, Molberg KH, Kroft SH. Clinicopathologic analysis of CD10+ and CD10–diffuse large B-cell lymphoma: identification of a high-risk subset with coexpression of CD10 and bcl-2. *American journal of clinical pathology*. 2001;116(2):183-90.
23. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A, et al. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell–like type of diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(6):961-8.
24. Barrans SL, Carter I, Owen RG, Davies FE, Patmore RD, Haynes AP, et al. Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2002;99(4):1136-43.
25. Wight JC, Chong G, Grigg AP, Hawkes EA. Prognostication of diffuse large B-cell lymphoma in the molecular era: moving beyond the IPI. *Blood reviews*. 2018;32(5):400-15.

26. Kendrick SL, Redd L, Muranyi A, Henricksen LA, Stanislaw S, Smith LM, et al. BCL2 antibodies targeted at different epitopes detect varying levels of protein expression and correlate with frequent gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Human pathology*. 2014;45(10):2144-53.
27. Zhang Y, Wang H, Ren C, Yu H, Fang W, Zhang N, et al. Correlation Between C-MYC, BCL-2, and BCL-6 Protein Expression and Gene Translocation as Biomarkers in Diagnosis and Prognosis of Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Frontiers in pharmacology*. 2019;9:1497.
28. Yeşilirmak A. Foliküler Lenfomaların ve Yeni Tanımlanmış Bcl2 Negatif Alt Grubunun Epha7, Ezh2 Ekspresyonu ve Bcl2 Break-Apart Açısından Analizi, Sonuçlarının Karşılaştırılması ve Histopatolojik Korelasyonu. 2014.
29. Kendrick S, Tus K, Wright G, Jaffe ES, Rosenwald A, Campo E, et al. Diffuse large B-cell lymphoma cell-of-origin classification using the Lymph2Cx assay in the context of BCL2 and MYC expression status. *Leukemia & lymphoma*. 2016;57(3):717-20.
30. Adam P, Baumann R, Schmidt J, Bettio S, Weisel K, Bonzheim I, et al. The BCL2 E17 and SP66 antibodies discriminate 2 immunophenotypically and genetically distinct subgroups of conventionally BCL2-“negative” grade 1/2 follicular lymphomas. *Human pathology*. 2013;44(9):1817-26.
31. Masir N, Campbell LJ, Jones M, Mason DY. Pseudonegative BCL2 protein expression in at (14; 18) translocation positive lymphoma cell line: a need for an alternative BCL2 antibody. *Pathology*. 2010;42(3):212-6.
32. Karube K, Campo E, editors. MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas. *Seminars in hematology*; 2015: Elsevier.
33. Chen Z, Guan P, Shan T, Ye Y, Gao L, Wang Z, et al. CD30 expression and survival in extranodal NK/T-cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2018;9(23):16547.
34. Nikolaenko L, Zain J, Rosen ST, Querfeld C. CD30-positive lymphoproliferative disorders. *T-Cell and NK-Cell Lymphomas*: Springer; 2019. p. 249-68.
35. Pierce JMR, Mehta A. Diagnostic, prognostic and therapeutic role of CD30 in lymphoma. *Expert review of hematology*. 2017;10(1):29-37.
36. Salas MQ, Climent F, Tapia G, DomingoDomènech E, Mercadal S, Oliveira AC, et al. Clinicopathologic features and prognostic significance of CD30 expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): results in a homogeneous series from a single institution. *Biomarkers*. 2020;25(1):69-75.
37. Julianty PF, Ham MF, Kusmardi K, Harahap AS. CD30 Expression in Germinal Center B-cell-like and non-Germinal Center B-cell-like Subtypes of Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2020;8(B):375-80.

38. Gong Q-X, Wang Z, Liu C, Li X, Lu T-X, Liang J-H, et al. CD30 expression and its correlation with MYC and BCL2 in de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of clinical pathology*. 2018;71(9):795-801.
39. Liu Y, Barta SK. Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *American Journal of Hematology*. 2019;94(5):604-16.
40. 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, The Journal of the American Society of Hematology*. 2013;121(14):2715-24.
41. Hao X, Wei X, Huang F, Wei Y, Zeng H, Xu L, et al. The expression of CD30 based on immunohistochemistry predicts inferior outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126615.
42. Xu J, Oki Y, Saksena A, Desai P, Lin P, Tang G, et al. CD30 expression and prognostic significance in R-EPOCH-treated patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Human pathology*. 2017;60:160-6.
43. Svoboda J, Bair SM, Landsburg DJ, Nasta SD, Nagle SJ, Barta SK, et al. Brentuximab vedotin in combination with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone as frontline treatment for patients with CD30-positive B-cell lymphomas. *Haematologica*. 2020.
44. Badri N, Ngamdu KS, Torabi A, Guar S. Brentuximab vedotin demonstrates an objective response in a patient with refractory CD30+ primary mediastinal B-cell lymphoma. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2020;16(1):183.
45. Bartlett NL, Smith MR, Siddiqi T, Advani RH, O'Connor OA, Sharman JP, et al. Brentuximab vedotin activity in diffuse large B-cell lymphoma with CD30 undetectable by visual assessment of conventional immunohistochemistry. *Leukemia & lymphoma*. 2017;58(7):1607-16.
46. Xia Y, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Li X, Manyam GC, Murty V, et al. Loss of PRDM1/BLIMP-1 function contributes to poor prognosis of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2017;31(3):625-36.
47. Vitolo U, Trněný M, Belada D, Burke JM, Carella AM, Chua N, et al. Obinutuzumab or rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone in previously untreated diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(31):3529-37.
48. Staiger AM, Ziepert M, Horn H, Scott DW, Barth TF, Bernd H-W, et al. Clinical impact of the cell-of-origin classification and the MYC/BCL2 dual expresser status in diffuse large B-cell lymphoma treated within prospective clinical trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(22):2515-26.

49. Ennishi D, Mottok A, Ben-Neriah S, Shulha HP, Farinha P, Chan FC, et al. Genetic profiling of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma determines cell-of-origin-specific clinical impact. *Blood*. 2017;129(20):2760-70.
50. Swerdlow S, Campo E, Pileri E, Harris N, Stein H, Siebert R. The updated WHO classification of hematological malignancies. The 2016 revision of the WHO classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-90.
51. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, et al. Genetics and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(15):1396-407.
52. Boltežar L, Prevodnik VK, Perme MP, Gašljević G, Novaković BJ. Comparison of the algorithms classifying the ABC and GCB subtypes in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncology letters*. 2018;15(5):6903-12.
53. 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;103(1):275-82.
54. Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clinical cancer research*. 2009;15(17):5494-502.
55. Özçerezci T, Baş Y. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomada Germinal Merkez B Hücre-Benzeri ve Germinal Merkez-Dışı B Hücre-Benzeri Orijinin Araştırılması. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 2019;39(3):310-8.
56. Harris NL, Stein H, Coupland SE, Hummel M, Favera RD, Pasqualucci L, et al. New approaches to lymphoma diagnosis. *ASH Education Program Book*. 2001;2001(1):194-220.
57. Falini B, Mason DY. Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. *Blood*. 2002;99(2):409-26.
58. Lu Z, Tsai AG, Akasaka T, Ohno H, Jiang Y, Melnick AM, et al. BCL6 breaks occur at different AID sequence motifs in Ig-BCL6 and non-Ig-BCL6 rearrangements. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2013;121(22):4551-4.
59. Lenz G, Wright GW, Emre NT, Kohlhammer H, Dave SS, Davis RE, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(36):13520-5.
60. Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Tai YC, Li Y, et al. Patients with diffuse large B-cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: a report from an

International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica*. 2013;98(2):255-63.

61. Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V, et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*. 2005;106(9):3183-90.

62. 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;106(5):1770-7.

63. Lu T-X, Fan L, Wang L, Wu J-Z, Miao K-R, Liang J-H, et al. MYC or BCL2 copy number aberration is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*. 2015;6(21):18374.

64. Li S, Seegmiller AC, Lin P, Wang XJ, Miranda RN, Bhagavathi S, et al. B-cell lymphomas with concurrent MYC and BCL2 abnormalities other than translocations behave similarly to MYC/BCL2 double-hit lymphomas. *Modern pathology*. 2015;28(2):208-17.

65. Quesada AE, Medeiros LJ, Desai PA, Lin P, Westin JR, Hawsawi HM, et al. Increased MYC copy number is an independent prognostic factor in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Modern Pathology*. 2017;30(12):1688-97.

66. Ma Q, Chang Y, Li L, Li X, Wang X, Wu J, et al. Efficacy of dose-adjusted EPOCH plus rituximab/R-CHOP regimens and the prognosis analysis in patients with MYC, BCL2/BCL6 gene copy number gain lymphoma and double-hit lymphoma: results from a single institution retrospective clinical study. *Cancer management and research*. 2019;11:1363.

67. Huang S, Nong L, Wang W, Liang L, Zheng Y, Liu J, et al. Prognostic impact of diffuse large B-cell lymphoma with extra copies of MYC, BCL2 and/or BCL6: comparison with double/triple hit lymphoma and double expressor lymphoma. *Diagnostic pathology*. 2019;14(1):81.

68. Bakış LG. *Türk Hematoloji Derneği*.

69. El-Galaly TC, Villa D, Michaelsen TY, Hutchings M, Mikhaeel NG, Savage KJ, et al. The number of extranodal sites assessed by PET/CT scan is a powerful predictor of CNS relapse for patients with diffuse large B-cell lymphoma: An international multicenter study of 1532 patients treated with chemoimmunotherapy. *European Journal of Cancer*. 2017;75:195-203.

70. Nijland M, Jansen A, Doorduyn JK, Enting RH, Bromberg JE, Kluin-Nelemans HC. Treatment of initial parenchymal central nervous system involvement in systemic aggressive B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. 2017;58(9):2074-9.

71. Chihara D, Fowler NH, Oki Y, Fanale MA, Fayad LE, Westin JR, et al. Dose-adjusted EPOCH-R and mid-cycle high dose methotrexate for patients with systemic

lymphoma and secondary CNS involvement. *British journal of haematology*. 2017;179(5):851.

72. Ferreri AJ, Cwynarski K, Pulczynski E, Fox CP, Schorb E, La Rosée P, et al. Whole-brain radiotherapy or autologous stem-cell transplantation as consolidation strategies after high-dose methotrexate-based chemoimmunotherapy in patients with primary CNS lymphoma: results of the second randomisation of the International Extranodal Lymphoma Study Group-32 phase 2 trial. *The Lancet Haematology*. 2017;4(11):e510-e23.

73. El-Galaly TC, Cheah CY, Bendtsen MD, Nowakowski GS, Kansara R, Savage KJ, et al. Treatment strategies, outcomes and prognostic factors in 291 patients with secondary CNS involvement by diffuse large B-cell lymphoma. *European Journal of Cancer*. 2018;93:57-68.

74. Antic D, Jelcic J, Trajkovic G, Balint MT, Bila J, Markovic O, et al. Is it possible to improve prognostic value of NCCN-IPI in patients with diffuse large B cell lymphoma? The prognostic significance of comorbidities. *Annals of hematology*. 2018;97(2):267-76.

75. Marcheselli R, Bari A, Tadmor T, Marcheselli L, Cox MC, Papotti R, et al. Improving the IPI score using peripheral blood counts: results of a large multicenter study involving 520 patients with diffuse large B cell lymphoma. *Hematological Oncology*. 2020.

76. Yang Y, Wang L, Ma Y, Han T, Huang M. The enhanced international prognostic index for diffuse large B-cell lymphoma. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2017;353(5):459-65.

77. Kulling PM, Olson KC, Olson TL, Feith DJ, Loughran Jr TP. Vitamin D in hematological disorders and malignancies. *European journal of haematology*. 2017;98(3):187-97.

78. Mortensen JB, Hansen IM, Clausen MR, Bjerre M, d'Amore F. Elevated Pre-Therapeutic Serum Levels of Soluble Programmed Death 1 Protein (sPD-1) Identify DLBCL Patients with Adverse Prognostic Features. *Blood*. 2017;130(Supplement 1):4148-.

79. Abdulla M, Guglielmo P, Hollander P, Åström G, Ahlström H, Enblad G, et al. Prognostic impact of abdominal lymph node involvement in diffuse large B-cell lymphoma. *European journal of haematology*. 2020;104(3):207-13.

80. Akay OM, Aras BD, Isiksoy S, Toprak C, Mutlu FS, Artan S, et al. BCL2, BCL6, IGH, TP53, and MYC protein expression and gene rearrangements as prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: a study of 44 Turkish patients. *Cancer genetics*. 2014;207(3):87-93.

81. Swerdlow SH. Diagnosis of 'double hit' diffuse large B-cell lymphoma and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt

lymphoma: when and how, FISH versus IHC. *Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book*. 2014;2014(1):90-9.

82. Li S, Desai P, Lin P, Yin CC, Tang G, Wang XJ, et al. MYC/BCL 6 double-hit lymphoma (DHL): a tumour associated with an aggressive clinical course and poor prognosis. *Histopathology*. 2016;68(7):1090-8.

83. Cucco F, Barrans S, Sha C, Clipson A, Crouch S, Dobson R, et al. Distinct genetic changes reveal evolutionary history and heterogeneous molecular grade of DLBCL with MYC/BCL2 double-hit. *Leukemia*. 2020;34(5):1329-41.

84. Ok CY, Medeiros LJ. High-grade B-cell lymphoma: a term re-purposed in the revised WHO classification. *Pathology*. 2020;52(1):68-77.

85. Rosenthal A, Younes A. High grade B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and BCL2 and/or BCL6: Double hit and triple hit lymphomas and double expressing lymphoma. *Blood reviews*. 2017;31(2):37-42.

86. Huang W, Medeiros LJ, Lin P, Wang W, Tang G, Khoury J, et al. MYC/BCL2/BCL6 triple hit lymphoma: a study of 40 patients with a comparison to MYC/BCL2 and MYC/BCL6 double hit lymphomas. *Modern Pathology*. 2018;31(9):1470-8.

87. Rosenwald A, Sehn LH, Maucort-Boulch D. Prognostic significance of MYC single, double, triple hit and MYC-translocation partner status in diffuse large B-cell lymphoma-a study by the Lunenburg lymphoma biomarker consortium (LLBC). *Blood*. 2018;132(Supplement 1):344-.

88. Herrera AF, Mei M, Low L, Kim HT, Griffin GK, Song JY, et al. Relapsed or refractory double-expressor and double-hit lymphomas have inferior progression-free survival after autologous stem-cell transplantation. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(1):24.

89. Akdemir M, Nalçacı M, Yenerel MN. Erişkin Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma Olgularında R-CHOP14 ve R-CHOP21 Kemoterapilerinin Karşılaştırılması.

90. Wiestner A. Targeting B-Cell receptor signaling for anticancer therapy: the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib induces impressive responses in B-cell malignancies. *J Clin Oncol*. 2013;31(1):128-30.

91. 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. *Leukemia & lymphoma*. 2015;56(5):1213-22.

92. Karmali R, Gordon LI. Molecular subtyping in diffuse large B cell lymphoma: closer to an approach of precision therapy. *Current treatment options in oncology*. 2017;18(2):11.

93. Rieder H, Bonwetsch C, Janssen L, Maurer J, Janssen J, Schwartz S, et al. High rate of chromosome abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization using BCR and ABL probes in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1998;12(9):1473-81.
94. Rodrigues-Fernandes CI, de Souza LL, Santos-Costa SFd, Pontes HAR, de Almeida OP, Vargas PA, et al. Clinicopathological analysis of oral diffuse large B-cell lymphoma, NOS: A systematic review. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2019;48(3):185-91.
95. van der Meeren L, Kluiver J, Rutgers B, Alsagoor Y, Kluin P, van den Berg A, et al. A super-SILAC based proteomics analysis of diffuse large B-cell lymphoma-NOS patient samples to identify new proteins that discriminate GCB and non-GCB lymphomas. *PloS one*. 2019;14(10):e0223260.
96. Yan L-X, Liu Y-H, Luo D-L, Zhang F, Cheng Y, Luo X-L, et al. MYC expression in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in Chinese patients with diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. *PloS one*. 2014;9(8):e104068.
97. Hwang HS, Park C-S, Yoon DH, Suh C, Huh J. High Concordance of Gene Expression Profiling–correlated Immunohistochemistry Algorithms in Diffuse Large B-cell Lymphoma, Not Otherwise Specified. *The American journal of surgical pathology*. 2014;38(8):1046-57.
98. Ma X-B, Zheng Y, Yuan H-p, Jiang J, Wang Y-P. CD43 expression in diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified: CD43 is a marker of adverse prognosis. *Human pathology*. 2015;46(4):593-9.
99. Nakayama S, Yokote T, Akioka T, Hiraoka N, Nishiwaki U, Miyoshi T, et al. Infiltration of effector regulatory T cells predicts poor prognosis of diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. *Blood Advances*. 2017;1(8):486-93.
100. Ohmachi K. JSH practical guidelines for hematological malignancies, 2018: II. Lymphoma-5—diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified (DLBCL, NOS). *International journal of hematology*. 2019;110(2):131-46.
101. Smith A, Roman E, Howell D, Jones R, Patmore R, Jack A, et al. The Haematological Malignancy Research Network (HMRN): a new information strategy for population based epidemiology and health service research. *British journal of haematology*. 2010;148(5):739-53.
102. Ko YH, Kim CW, Park CS, Jang HK, Lee SS, Kim SH, et al. REAL classification of malignant lymphomas in the Republic of Korea: incidence of recently recognized entities and changes in clinicopathologic features. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 1998;83(4):806-12.

103. Lee M-Y, Tan T-D, Feng A-C, Liu M-C. Clinicopathological analysis of malignant lymphoma in Taiwan, defined according to the World Health Organization classification. *Haematologica*. 2005;90(12):1703-5.
104. Mozaheb Z. Epidemiology of lymphoid malignancy in Asia. *Epidemiology Insights In: De Lourdes Ribeiro De Souza Da Cunha M, editor London: In Tech*. 2012:325-54.
105. Møller MB, Pedersen NT, Christensen BE. Diffuse large B-cell lymphoma: clinical implications of extranodal versus nodal presentation—a population-based study of 1575 cases. *British journal of haematology*. 2004;124(2):151-9.
106. Ollila TA, Olszewski AJ. Extranodal diffuse large B cell lymphoma: molecular features, prognosis, and risk of central nervous system recurrence. *Current treatment options in oncology*. 2018;19(8):38.
107. Gutierrez-Garcia G, Colomo L, Villamor N, Arenillas L, Martinez A, Cardesa T, et al. Clinico-biological characterization and outcome of primary nodal and extranodal diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Leukemia & lymphoma*. 2010;51(7):1225-32.
108. De Paepe P, De Wolf-Peeters C. Diffuse large B-cell lymphoma: a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas comprising several distinct clinicopathological entities. *Leukemia*. 2007;21(1):37-43.
109. Copie-Bergman C, Cuillière-Dartigues P, Baia M, Briere J, Delarue R, Canioni D, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2015;126(22):2466-74.
110. Valera A, López-Guillermo A, Cardesa-Salzmann T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, et al. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica*. 2013;98(10):1554-62.
111. Skinnider BF, Horsman DE, Dupuis B, Gascoyne RD. Bcl-6 and Bcl-2 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma: correlation with 3q27 and 18q21 chromosomal abnormalities. *Human pathology*. 1999;30(7):803-8.
112. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2013;121(20):4021-31.
113. Muris J, Meijer C, Vos W, van Krieken J, Jiwa N, Ossenkoppele G, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression

improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2006;208(5):714-23.

114. Ichiki A, Carreras J, Miyaoka M, Kikuti YY, Jibiki T, Tazume K, et al. Clinicopathological analysis of 320 cases of diffuse large B-cell lymphoma using the hans classifier. *Journal of clinical and experimental hematopathology*. 2017;57(2):54-63.

115. Al-Humood SA, Al-Qallaf AS, AlShemmari SH, Francis IM, Junaid TA, Marouf RA, et al. Genotypic and phenotypic differences between nodal and extranodal diffuse large B-cell lymphomas. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2011;59(10):918-31.

116. 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. *Journal of clinical oncology*. 2012;30(28):3452.

117. Wang XJ, Medeiros LJ, Lin P, Yin CC, Hu S, Thompson MA, et al. MYC cytogenetic status correlates with expression and has prognostic significance in patients with MYC/BCL2 protein double-positive diffuse large B-cell lymphoma. *The American journal of surgical pathology*. 2015;39(9):1250-8.

118. Colomo L, López-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martinez A, Bosch F, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2003;101(1):78-84.

119. Kramer M, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, Van Krieken J, et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 1998;92(9):3152-62.

120. Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J clin oncol*. 2012;30(28):3460-7.

121. Lu T-X, Miao Y, Wu J-Z, Gong Q-X, Liang J-H, Wang Z, et al. The distinct clinical features and prognosis of the CD10+ MUM1+ and CD10- Bcl6- MUM1- diffuse large B-cell lymphoma. *Scientific reports*. 2016;6:20465.

122. Cutrona G, Tasso P, Dono M, Roncella S, Ulivi M, Carpaneto E, et al. CD10 is a marker for cycling cells with propensity to apoptosis in childhood ALL. *British journal of cancer*. 2002;86(11):1776-85.

123. Bai M, Agnantis N, Skyrilas A, Tsanou E, Kamina S, Galani V, et al. Increased expression of the bcl6 and CD10 proteins is associated with increased apoptosis and

proliferation in diffuse large B-cell lymphomas. *Modern pathology*. 2003;16(5):471-80.

124. Perry AM, Alvarado-Bernal Y, Laurini JA, Smith LM, Slack GW, Tan KL, et al. MYC and BCL 2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *British journal of haematology*. 2014;165(3):382-91.

