

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMALARDA
SİTOGENETİK OLARAK ALT TİPLERİN VE
BUNLARIN PROGNOTİK ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

ÖZGE ÇOKBANKİR

İZMİR-2013

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMALARDA
SİTOGENETİK OLARAK ALT TİPLERİN VE
BUNLARIN PROGNOTİK ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ÖZGE ÇOKBANKİR

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Sermin ÖZKAL

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	ii
RESİM LİSTESİ	ii
GRAFİK VE ŞEKİL LİSTESİ.....	iii
KISALTMALAR.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vi
ÖZET	1
İNGİLİZCE ÖZET	3
GİRİŞ VE AMAÇ	5
GENEL BİLGİLER	7
GEREÇ VE YÖNTEM	19
BULGULAR	33
TARTIŞMA.....	60
SONUÇLAR.....	67
KAYNAKLAR.....	68

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.B hücreli neoplaziler- WHO (DSÖ) 2008 sınıflaması

Tablo 2.DBBHL varyantları, altgrupları ve alttipleri- WHO (DSÖ) 2008 DBBHLsınıflaması

Tablo 3.International Prognostik Index skoru (IPI skoru)

Tablo 4.Ann-arbor evreleme sistemi

Tablo 5.Hastaların özellikleri ve Bcl-2, Bcl-6, Ki-67, EBER ve C-myc değerleri

Tablo 6.Hastaların özellikleri ile Bcl-2, Bcl-6 değerlerinin ilişkisi

Tablo 7.Hastaların özellikleri ile C-myc, EBER RNA ve Ki-67 değerlerinin ilişkisi

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Diffüz Büyük B hücreli lenfoma. Hematoksilen-Eozin X100

Resim 2: Diffüz Büyük B hücreli lenfoma. Hematoksilen-Eozin X400

Resim 3: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada sitoplazmik Bcl-2 immunreaktivitesi (X400)

Resim 4: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada sitoplazmik Bcl-6 immunreaktivitesi (X400)

Resim 5A: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada yüksek nükleer KI-67 immunreaktivitesi (X400)

Resim 5B: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada düşük nükleer KI-67 immunreaktivitesi (X400)

Resim 6: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada CISH yöntemi ile Eber pozitifliği 1(+) (X400)

Resim 7: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada CISH yöntemi ile Eber pozitifliği 2(++) (X400)

Resim 8A-B: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada CISH yöntemi ile Eber pozitifliği 3(+++) (X400)

Resim 9A-B: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada FISH yöntemi ile c-myc yeniden düzenlenmesi saptanmayan olgu (normal gen düzenlenimi)

Resim 10A-B: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada FISH yöntemi ile saptanan c-myc yeniden düzenlenmesi

GRAFİK LİSTESİ

- Grafik 1.** B semptomu varlığı - cinsiyet ilişkisi
- Grafik 2.** C-myc yeniden düzenlenmesi varlığı- R-IPI ilişkisi
- Grafik 3.** Kaplan Meier eğrisi ile gösterilen genel sağkalım oranı
- Grafik 4.** c-myc pozitifliği ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier eğrisi
- Grafik 5.** EBER RNA pozitifliği ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier eğrisi
- Grafik 6.** Cinsiyet ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier eğrisi
- Grafik 7.** 60 yaş grubu ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier eğrisi
- Grafik 8.** Nodal ve ektranodal tutulumu olan hastalarda sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier eğrisi
- Grafik 9.** Serum LDH değerleri ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier eğrisi
- Grafik 10.** Bcl-2 değeri ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier eğrisi
- Grafik 11.** Bcl-6 değeri ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier eğrisi
- Grafik 12.** CD30 değeri ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier eğrisi

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** GCB hücre kökenli ve Non-GCB hücre kökenli DBBHL
- Şekil 2.** Myc/Cen-8 FISH DNA Prob-miks şematik görünümü

KISALTMALAR

DBBHL	: Diffüz Büyük B hücreli Lenfoma
BBHL	: Büyük B Hücreli Lenfoma
WHO (DSÖ)	: Dünya Sağlık Örgütü
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
BL	: Burkitt Lenfoma
NHL	: Non-Hodgkin Lenfoma
HL	: Hodgkin Lenfoma
IBL	: İmmunoblastik lenfoma
NLPHL	: Nodüler Lenfosit Predominant Hodgkin Lenfoma
ABC:	Aktive B hücre Kökenli
GCB	: Germinal Merkez B hücre kökenli
GM	: Germinal merkez
WF	: Working Formulation
CLL/SLL	: Kronik lenfositik Lösemi/Küçük lenfositik lenfoma
EBV	: Epstein- barr virüs
CISH	: Kromojenik İn Situ Hibridizasyon
FISH	: Floresan İn Situ Hibridizasyon
ISH	: İn Situ Hibridizasyon
IHK	: İmmunohistokimya
IM	: Işık Mikroskopi
IPI	: International Prognostic index (Uluslararası Prognostik indeks)

R-IPI : Revised International Prognostic Index (Revize uluslararası prognostik indeks)

DHL : Double Hit Lenfoma

THL : Triple Hit Lenfoma

TEŞEKKÜR

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yepyeni bir hayata başladığım asistanlık sürecim boyunca; bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, emeklerini ve haklarını hayatım boyunca ödeyemeyeceğim;

Sayın dekanımız ve çok değerli Hocamız Prof. Dr. Tülay Canda'ya,

Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Erdener Özer'e,

Tezimin ilk gününden son aşamasına kadar desteğini ve emeğini benden hiç esirgemyen Sayın Hocam Prof. Dr. Sermin Özkal'a

Birbirinden kıymetli Hocalarımız Prof. Dr. Meral Koyuncuoğlu, Prof. Dr. Kutsal Yörükoğlu, Prof. Dr. Sülen Sarioğlu, Prof. Dr. Burçin Tuna, Prof. Dr. Özgül Sağol, Prof. Dr. Banu Lebe, Prof. Dr. Çağnur Ulukuş, Doç. Dr. Merih Güray Durak, Doç. Dr. Duygu Gürel, Uzm. Dr. Ş. Mehtat Ünlü ve Uzm. Dr. Ayça Erşen Danyeli'ye,

Yakın zamanda emekli olan, deneyimlerinden faydalanma şansına erişebildiğim sayın Hocalarımız; Prof. Dr. Şerefettin Canda, Prof. Dr. Uğur Pabuççuğlu ve Prof. Dr. Aydanur Kargı'ya

Tezimin istatistiği konusunda yardımlarını esirgemeyen H.Atilla Atasever'e

Hematoloji kliniği hasta kayıtlarına ulaşmamda yardımını, tez süresince her türlü desteği ve güler yüzünü benden esirgemeyen Dr. Aybüke Olgun'a

Tanımdan gurur duyduğum, kendilerinden çok şey öğrendiğim ve öğreneceğim çok değerli makroskopi teknisyenlerimiz Serkan Aydınoglu ve Mert Demir Kırmızı ve Kamuran Elmas'a,

Tezimin en zorlu süreçlerinde yanımda olan, bana moral ve destek veren teknisyenlerimiz Ayşen Çayan'a, Nalan Okay'a ve Yahya Tufan Orhan'a,

Sevgi ve saygı çerçevesinde hergün emek vererek beraber çalıştığımız tüm teknisyenlerimize, tüm değerli sekreterlerimize ve Dako Firma yetkilisi Sayın Nurettin Aybaş'a

Tanımaktan mutluluk ve gurur duyduğum, iyi ve kötü her günümde yanımda olan, hayatımda her zaman olmalarını istediğim, vazgeçilmezlerim çok sevdiğim asistan dostlarıma (kardeşlerime),

Bu süreçte ve hayatım boyunca hiçbir zaman elimi bırakmayan ve bırakmayacağını bildiğim, varlıklarını hiçbirşeye değiştirmeyeceğim, çok sevdiğim, canım annem Rüya Ertener'e, canım babam Necip Ertener'e, güzeller güzeli ablam Görkem Özer'e ve canım eniştem Erden Özer'e,

Bu sıkıntılı süreci benimle paylaşan ve hep destek olan, mutsuz günlerimde beni neşelendirmek için elinden geleni yapan, benimle ders çalışmak zorunda kalan, çok sevdiğim canım eşim Volkan Çokbankir'e sonsuz teşekkür ediyorum.

Özge ÇOKBANKİR

İzmir, 2013

ÖZET

DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMALARDA SİTOGENETİK OLARAK ALT TİPLERİN VE BUNLARIN PROGNOSTİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Özge ÇOKBANKİR

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

ozge.ertener@gmail.com

Amaç: Diffüz Büyük B hücreli lenfomalar (DBBHL); erişkinlerdeki en sık Non-Hodgkin lenfoma tipidir. Klinik, morfolojik, immunfenotipik ve sitogenetik olarak heterojenite göstermektedirler. Bu nedenle farklı klinik gidiş ve sağkalıma sahiptirler. Bu çalışmanın amacı; DBBHL'nın bu heterojenite gösteren özelliklerini ortaya koymanın yanı sıra; EBV RNA varlığının ve C-myc translokasyonunun; klinikopatolojik parametreler ile ilişkisini araştırmak ve bu ilişkinin prognoz ve sağkalıma etkisini ortaya koymaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 50 DBBHL olgusu değerlendirilmiştir. Bu olgularda immunhistokimyasal yöntem ile Bcl-2, Bcl-6, CD30 ve Ki-67 ekspresyonu belirlendi. Kromojenik İn situ Hibridizasyon yöntemi (CISH) ile EBER (EBV RNA) varlığı, Floresan İn situ Hibridizasyon (FISH) yöntemiyle C-myc yeniden düzenlenmesi varlığı ve bu değerlerin prognoza ve sağkalıma etkileri araştırıldı.

Bulgular: Olguların; yaşı, cinsiyeti, LDH düzeyleri, IPI skoru ve olgularda B semptomu varlığı ile sağkalımları arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde; B semptomu görülme oranının erkeklerde daha yüksek olması ($p=0.005$) istatistiksel olarak sınırda anlamlıydı. Bununla birlikte 13 olguda (%26) EBV RNA, 6 olguda (%12) C-myc yeniden düzenlenmesi saptandı. 26 olguda (%52) Bcl-2, 27 olguda (%54) Bcl-6 pozitif olarak değerlendirildi. Ki-67 proliferasyon indeksi 17 olguda (%34) ≤ 50 ; 33 olguda (%66) > 50 ve üzeri olarak değerlendirildi. Bcl-2, Bcl-6 ekspresyonu, Ki-67 proliferasyon indeksi, c-myc yeniden düzenlenmesi ve EBV RNA varlığı ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmadı.

Sonuç: DBBHL’lar; histomorfolojik ve genetik olarak heterojen bir grubu oluşturduklarından farklı klinik gidiőe, tedavide farklı yanıtı ve sağkalıma sahiptirler. Etkili tedavilerin belirlenmesi ve sağkalımın uzatılabilmesi için bu genetik farklılıklar ortaya konmalıdır. Bunun için; düzenli klinik takibe sahip geniş serili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Diffüz Büyük B hücreli Lenfoma, Double Hit lenfoma, C-myc yeniden düzenlenmesi, EBV RNA

ABSTRACT

RESEARCH OF THE SUBTYPES CYTOGENETICALLY IN DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMAS AND THEIR PROGNOSTIC CHARACTERISTICS

Ozge COKBANKIR MD

Dokuz Eylul University Faculty of Medicine Department of Pathology

ozge.ertener@gmail.com

Aim: Diffuse Large B cell lymphomas (DLBCL) is the mostly encountered Non-Hodgkin lymphoma type with the adults. It shows heterogeneity clinically, morphologically, immunophenotypically and cytogenetically. Because of this reason, they have different clinical course and survival. The aim of this study is; to put forward the characteristics of DLBCL showing this heterogeneity and also to study the relationship of the EBV RNA presence and C-myc translocation with the clinicopathological parameters and to reveal the influence of this relationship on prognosis and survival.

Methods: In our study; 50 cases with the DLBCL were investigated. Bcl-2, Bcl-6, CD30 and Ki-67 expressions are specified by means of the immunohistochemical methods. EBER (EBV RNA) presence is studied with the Chromogenic In situ Hybridization method (CISH) and the C-myc rearrangement presence is studied with the Florescent In situ Hybridization (FISH) method. Nonetheless the influence of these values on prognosis and survival were investigated.

Results: Whenever the relationships between the ages, sex, LDH levels, IPI score results and the B symptom presence of the cases and their survivals compared; it was meaningful that the rate of presence of the B symptom with the males was higher statistically ($p=0.005$). In addition to this, EBV RNA rearrangement is determined with 13 cases (26%) and C-myc rearrangement is determined with 6 cases (12%). Bcl-2 expression is evaluated in 26 cases (52%) and Bcl-6 expression in 27 cases (54%) Ki-67 proliferation index is evaluated as $<50\%$ in 17 cases (34%) and 50% and above in 33 cases (66%). No meaningful result could be found sta-

tistically between Bcl-2, Bcl-6 expression, Ki-67 proliferation index, c-myc rearrangement and EBV RNA presence and the survival.

Conclusion: DLBCL's have different clinical course, different response in treatment and survival because of the fact that they form a heterogeneous group histomorphologically and genetically. These genetic differences should be revealed in order to specify the effective treatments and to extend the survival. For this purpose; there is need for the widespread studies having regular clinical follow-up.

Key words: Diffuse Large B cell Lymphoma, Double Hit Lymphoma, C-myc rearrangement, EBV RNA

GİRİŞ VE AMAÇ

Diffüz büyük B-hücreli lenfomalar (DBBHL) B hücre fenotipine sahip, erişkin NonHodgkin lenfomalarının en sık görülen alt tipidir. DBBHL'lar; agresif gidişli, tedavisiz ölüme neden olabilen; klinik, morfolojik, immunfenotipik ve sitogenetik olarak heterojen özellikte lenfomalardır. Bu heterojeniteden dolayı DBBHL'lar kendi içerisinde değişken klinik gidiş ve sağkalıma sahiptirler. DBBHL'larda prognoza etkili olabilecek fenotipik, klinik, immunohistokimyasal ve sitogenetik farklılıkların saptanması son yıllarda önem kazanmış araştırma konularındandır.

DBBHL'da yaş, cinsiyet, B semptomlarının varlığı, nodal ve ektranodal tutulum alanları, klinik evre ve serum laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyi gibi klinik parametreler sıklıkla araştırma konusu olmuştur. Bu değişkenler birbirinden bağımsız olarak sağkalımı etkileyebildiği gibi, birkaç parametrenin değerlendirilmesi ile hesaplanan IPI skoru da prognoz üzerinde önemli etkiye sahiptir. Klinik olarak Uluslararası Prognostik İndeks (IPI) veya Revize Uluslararası Prognostik İndeks (R-IPI) skorlama sistemi prognozu belirlemek için kullanılmakla birlikte, histopatolojik değerlendirmede proliferasyon indeksi dışında net bir parametre kullanılmamaktadır. Ancak; DBBHL'larda her zaman bu klinik parametreler ve IPI skoru prognozu belirlemede yeterli olamamaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile IPI'dan bağımsız bazı prognostik faktörler ortaya konmuştur. Çeşitli immünhistokimyasal belirteçler ve moleküler teknikler kullanılarak DBBHL'ları alt gruplara ayırmak ve bunların prognozla ilişkilerini ortaya koymak için çok sayıda araştırma yapılmaktadır.

C-myc yeniden düzenlenmesi; Burkitt lenfomanın yanısıra yaklaşık %15 DBBHL hastasında saptanmaktadır. C-myc; hücre siklusu progresyonunu sağlayacak bazı genleri aktive edip, bazı inhibitör proteinleri inhibe ederken farklı yollardan apoptozisi de aktive etmektedir. C-myc yeniden düzenlenmesi; literatürde sıklıkla agresif klinik gidiş ile ilişkili bulunmuştur. C-myc yeniden düzenlenmesine sahip daha agresif gidişli DBBHL olgularının yanısıra Burkitt lenfomanın morfolojik özelliklerini gösteren ve yüksek proliferatif indekse sahip ancak; myc translokasyonu göstermeyen olgular da bulunmaktadır. Son DSÖ sınıflamasında (DSÖ 2008) bu olguların bir kısmı "DBBHL ve BL özellikleri arasında kalan başka türlü sınıflandırılmayan B-hücreli lenfomalar" grubu altında sınıflandırılmışlardır. Bu heterojen

grup içinde sınıflanan bir grup lenfomanın önümüzdeki sınıflamalarda daha net özellikleriyle belirgin alt gruplara ayrılacağı düşünülmektedir.

Bununla birlikte literatürde Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemiyle “c-myc” yeniden düzenlenmesi ile eş zamanlı olarak BCL2 veya BCL-6 translokasyonu gösteren ayrı bir B hücreli lenfoma grubu daha ortaya çıkmaktadır. Bu grup; “Double Hit (dual hit)” Lenfomalar (DHL) olarak adlandırılmaktadır. DHL’lar; tanı anında yüksek LDH düzeyi, B semptomları varlığı, kemik iliği tutulumu, ileri evre hastalık, ekstrasnodal tutulum, santral sinir sistemi tutulumu gibi özelliklerle karakterize BL ve DBBHL’lara göre daha kötü prognozlu bir B hücreli lenfoma grubu olarak tanımlanmaktadır. Bu olgular günümüzde genellikle “DBBHL ve BL özellikleri arasında kalan başka türlü sınıflandırılmayan B-hücreli lenfomalar” grubu altında sınıflandırılmaktayken bu farklı özelliklerinden dolayı; bu olguları tanımak ve ayrı bir grup altında sınıflandırmak önem kazanmaktadır.

EBER (EBV RNA) varlığı; DBBHL’larda %8-11 arasında görülmekle birlikte; sıklıkla daha ileri yaşla (60 yaş üzerinde), daha ileri evre hastalıkla ve DBBHL’nın anaplastik ve plazmoblastik alt tipleriyle ilişkili bulunmuştur. Bu hastalarda tedavi yanıtı ve sağkalım sıklıkla; EBV RNA taşımayan olgulara göre daha düşük bulunmuştur.

Literatürdeki bu bilgilerin ışığında, bu çalışma; DBBHL’nın klinik, biyolojik, immunfenotipik ve sitogenetik özelliklerini ortaya koymanın yanısıra; bu olgularda CISH yöntemiyle saptanan EBER (EBV RNA) varlığının ve FISH yöntemiyle saptanan C-myc translokasyonunun; klinikopatolojik parametreler ile ilişkisinin araştırılmasını ve bu ilişkinin prognoz ve sağkalıma etkili olup olmadığını göstermeyi amaçlamaktadır. Bununla birlikte bu çalışmada olguların Bcl-2, Bcl-6, CD30 ve Ki-67 ekspresyonuna yönelik immunfenotipik özellikleri de incelenmiş olup bunların prognostik önemleri ve sağkalıma etkileri de değerlendirilmiştir.

GENEL BİLGİLER

DİFFÜZ BÜYÜK B-HÜCRELİ LENFOMA (DBBHL)

Diffüz Büyük B hücreli lenfomalar (DBBHL) erişkinde en sık görülen Non-Hodgkin lenfoma (NHL) alt tipidir (1-5). (Tablo 1). Tüm lenfoid malignitelerin %30'unu, Non-Hodgkin lenfomaların ise %30-40'ını oluşturmaktadır (3,6,7).

DBBHL; normal bir lenfositin iki katından büyük veya bir makrofaj nükleusu ile eşit veya ondan daha büyük boyutlu neoplastik B hücrelerin diffüz proliferasyonu ile karakterize heterojen, agresif bir lenfoma grubu olarak tanımlanmaktadır (1). Bazı kaynaklarda potansiyel olarak tedavi edilebilir bir hastalık olarak tanımlansa da uzun dönem remisyon, günümüz tedavi koşullarında yaklaşık %40 olarak bildirilmiştir (1,6). DBBHL'lar; Non-Hodgkin lenfoma grubu içerisinde en kompleks, klinik ve morfolojik olarak da en heterojen grubu oluşturmaktadırlar (1-2).

NHL'lar için 1970'li yıllardan günümüze Rappaport, Lukes&Collins, Kiel, Working formulation ve REAL sınıflaması gibi birçok farklı sınıflama kullanılmıştır. REAL sınıflaması; 2001 yılında WHO (DSÖ) sınıflamasına revize edilmiştir. Son olarak da DSÖ sınıflaması 2008 yılında güncellenmiş olup halen günümüzde DSÖ 2008 sınıflaması geçerliliğini korumaktadır (8).

Tablo 1: B Hücreli neoplaziler- WHO (DSÖ) 2008 sınıflaması:

Öncül B hücreli lenfoblastik lösemi / lenfoma
Matür B hücreli neoplazmlar
Kronik lenfositik lösemi / küçük lenfositik lenfoma
B hücreli prolenfositik lösemi
Splenik Marjinal zon lenfoma
Hairy cell lösemi (Tüylü hücreli lösemi)
Splenik lösemi/lenfoma, sınıflandırılmayan
Lenfoplasmositik lenfoma
Ağır zincir hastalığı
Plazma hücreli neoplazi
Mukoza ilişkili ektranodal marjinal zon lenfoması (MALT tipi)
Nodal marjinal zon lenfoma
Foliküler lenfoma
Primer kutanöz follikül merkezli lenfoma
Mantle hücreli lenfoma
Diffüz büyük B-hücreli lenfoma
Diffüz Büyük B hücreli lenfoma , başka türlü sınıflandırılmayan
Diffüz Büyük B hücreli lenfoma , alt grupları*
Diğer Büyük B hücreli neoplaziler*
Burkitt lenfoma
Borderline olgular*

*Tablo 2’de ayrıntıları anlatılacaktır.

WHO 2008 sınıflamasında; DBBHL'lar için histomorfolojik, immunhistokimyasal ve moleküler temele dayanılarak farklı varyantlar tanımlanmıştır (Tablo 2). Morfolojik varyantları “sık” ve “nadir” olmak üzere 2 ana gruba ayrılmaktadır. Sık görülen morfolojik varyantları; sentroblastik, immunoblastik ve anaplastik varyant iken bunların dışında miksoid stroma veya fibriler matriks içeren, içsi görünümde veya taşlı yüzük benzeri morfolojide olan daha nadir görülen morfolojik varyantları da tanımlanmıştır (1,7).

Sık Görülen Morfolojik Varyantlar:

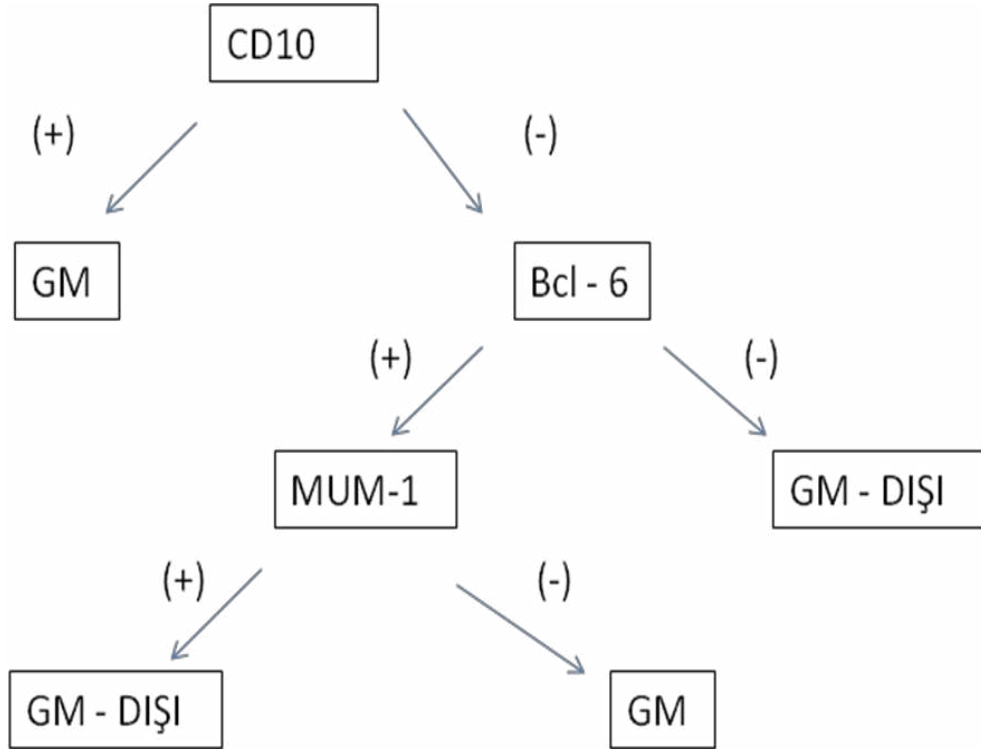
A- Sentroblastik varyant : En sık görülen varyanttır. Bazı olgularda tümör monomorfik olup % 90'dan fazla sentroblast içerirken bazıları sentroblast ve immunoblastları beraber içerecek şekilde polimorfik özelliktedir.

B- İmmunoblastik varyant : %90'dan fazlası immunoblastlardan oluşan varyanttır. Hashimoto tiroiditi, Sjögren hastalığı, Lupus eritematozus gibi immun aracılı hastalıklarda en sık görülen DBBHL varyantıdır.

C. Anaplastik varyant : En nadir görülen varyanttır. Hodgkin ve/veya Reed-Sternberg hücresi ya da anaplastik büyük hücreli lenfoma hücrelerine benzer özellikte tümör hücrelerinden oluşan varyanttır (9).

Moleküler alt grupları ise; Germinal Merkez Kökenli (GCB) ve Aktive B Hücre kökenli (ABC) olmak üzere 2 alt grupta incelenmektedir (1,10,11).

İmmunhistokimyasal alt grupları ise; CD5 pozitif DBBHL, Germinal Merkez Kökenli (GCB) ve Germinal Merkez Dışı Kökenli (non-GCB) olmak üzere 3 farklı alt grupta sınıflandırılmıştır. Bu alt grupların belirlenmesi için CD10, Bcl-6, IRF-4/MUM-1 İmmunhistokimyasaları kombine olarak kullanılmaktadır (1,10,11) (Şekil 1).



Şekil 1: GCB Hücre kökenli ve Non-GCB hücre kökenli DBBHL

Diğer DBBHL alt tipleri arasında ise; T hücre /histiositten zengin DBBHL, Santral sinir sisteminin primer BBHL ‘sı, primer kutanöz DBHHL, bacak tipi DBBHL, yaşlılığın EBV pozitif DBBHL’sı gibi antiteler yer almaktadır. Özel bir alt tipe veya hastalığa ait olmayanlar ise; bu gruplar altında sınıflandırılmamıŐ olup; DBBHL, başka türlü adlandırılmayan (NOS) adı altında toplanmıştır (1,12).

Tablo 2: DBBHL Varyantları, altgrupları ve alttipleri- WHO (DSÖ) 2008 DBBHL sınıflaması

DİFFÜZ BÜYÜK B-HÜCRELİ LENFOMA, BAŞKA TÜRLÜ SINIFLANDIRILAMAYAN	
SIK GÖRÜLEN MORFOLOJİK VARYANTLAR:	
Sentroblastik	
İmmunoblastik	
Anaplastik	
NADİR GÖRÜLEN MORFOLOJİK VARYANTLAR	
MOLEKÜLER ALT GRUPLAR:	- GCB hücre kökenli - ABC hücre kökenli
İMMUNOHİSTOKİMYASAL ALT GRUPLAR:	- CD5 Pozitif DBBHL - GCB hücre kökenli -Non-GCB hücre kökenli
DBBHL ALTGRUPLARI:	
T-hücre/histiositten zengin Diffüz Büyük B-hücreli lenfoma	
Santral sinir sisteminin primer Diffüz Büyük B hücreli Lenfoması	
Primer kutanöz bacak tipi DBBHL	
Yaşlılığın EBV pozitif DBBHL'sı	
DİĞER BÜYÜK B HÜCRELİ NEOPLAZİLER:	
Primer mediastinal (timik) büyük B-hücreli lenfoma	
İntravasküler büyük B-hücreli lenfoma	
Kronik inflamasyonla ilişkili DBBHL	
Lenfomatoid granulomatozis	
ALK pozitif büyük B- hücreli lenfoma	
Plazmoblastik lenfoma	
HHV-8 ilişkili Castleman Hastalığı zemininde gelişen DBBHL	
Primer efüzyon lenfoması	
BORDERLİNE VAKALAR:	
DBBHL ve BL özellikleri arasında kalan başka türlü sınıflandırılmayan B-hücreli lenfoma	
DBBHL ve Klasik HL özellikleri arasında kalan başka türlü sınıflandırılmayan B-hücreli lenfoma	

EPİDEMİYOLOJİ

DBBHL'lar Batı ülkelerinde görülen tüm Non- Hodgkin lenfomaların yaklaşık %30-40' ını oluşturmaktadır (3,6,7). Gelişmekte olan ülkelerde ve Asya toplumlarında ise daha yüksek görülme oranları bildirilmektedir (13).

DBBHL'lar tüm yaş gruplarında görülebilmekle beraber daha sıklıkla erişkinlerde ve özellikle 7. Dekatta daha sık izlenmektedirler (13).

ETYOLOJİK FAKTÖRLER

DBBHL'ların etyolojisi net olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte sıklıkla de novo olarak gelişmektedirler (1). Bununla birlikte daha az agresif ve daha düşük dereceli lenfomalar olan foliküler lenfoma, kronik lenfositik lösemi/küçük lenfositik lenfoma, Nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfoma veya marginal zon lenfoma gibi lenfomalardan progresyon ya da transformasyon ile de karşımıza çıkabilmektedirler (1,13).

DBBHL olgularının çoğunda herhangi bir risk faktörü bulunmamaktadır. Bununla birlikte; Ataksi-telenjektazi sendromu, Bruton tipi agamaglobulinemi, Ciddi kombine immünyetmezlik hastalığı, Wiskott-Aldrich Sendromu, Duncan Sendromu, Chediak-Higashi sendromu gibi herediter immünyetmezlik sendromları; Human immunodeficiency virus (HIV), Epstein-Barr virus (EBV), Helicobacter pilori, Hepatit C virusu (HCV), Human T-Hücreli lösemi virusu (HTLV), and Human Herpes virusu (HHV) gibi enfeksiyonlar; Romatoid artrit, Sjögren sendromu, Sistemik lupus eritematozus gibi otoimmün hastalıklar; kemoterapötik ajan ve immunsupresan ilaç kullanımı; Herbisid, Vinil klorid ve organik solventlere maruziyet gibi etyopatogeneizde rol oynayabilecek birçok antite risk faktörleri arasında sayılabilmektedir (14,15).

Etyopatogeneizler arasında sayılan enfeksiyöz ajanlardan özellikle EBV ve HHV-8 ön plana çıkmaktadır. HHV-8 ilişkili multisentrik Castleman hastalığında gelişen DBBHL, yaşlıların EBV pozitif DBBHL ve kronik inflamasyon ilişkili (EBV ilişkili) DBBHL olmak üzere 3 ayrı alttipi WHO 2008 sınıflamasında ayrı tanımlanan antiteler olarak önem kazanmıştır (1,16,17).

YAŞLININ EBV POZİTİF DBBHL'SI

2008 DSÖ sınıflamasında; yaşlının EBV pozitif DBBHL'sı olarak yeni bir antite eklenmiştir. Bu antitenin 50 yaş üzerindeki hastalarla ve EBV pozitifliği ile ilişkisi bulunmuştur. DBBHL'nın bu alt tipinde EBV'ün tümör mikroçevre kompozisyonunda, anti-tümör yanıtını engellemede ve hastalığın progresyonunda rol alabileceği gösterilmiştir (16,17).

Yaşlının EBV pozitif DBBHL'sı; 50 yaş üzerindeki hastalarda görülen, hafif erkek baskınlığı izlenen, tahminen immunsistemin gerilemesinden (yaşlanmasından) kaynaklanan EBV ile ilişkili, blastik, klonal B hücre proliferasyonu olarak tanımlanmaktadır (1,17,18). Bu antitenin morfolojik olarak; 2 alt tipi tanımlanmıştır. Bunlardan baskın olanı; polimorfik alt tiptir. Bu alt tip transforme hücrelerin, plazma hücrelerinin, plazmoblastların, lenfositlerin ve sıklıkla R&S benzeri hücrelerin karışımından oluşan mikst bir proliferasyondur. Monomorfik alt tip ise; tabakalar halinde büyük hücre popülasyonundan meydana gelmektedir (1,19,20). Ek karakteristik özellik ise geniş alanlar kaplayan geografik nekrozdur. Yaşlının EBV pozitif DBBHL'sı pan B hücre markerları ile ve sıklıkla da CD30 ile pozitiflik göstermektedir. EBV enfeksiyonu ise ISH yöntemi ile EBER'in saptanması ile tespit edilmektedir.

Bu antite ile en çok karışan hastalık daha yaşlılarda görülen EBV pozitif klasik Hodgkin lenfomadır. Yaşlıların EBV pozitif DBBHL'sı Asya toplumlarında görülen DBBHL'ların %8-10'unu oluştururken Batı toplumlarında bu oran daha düşüktür. Klinik olarak; nodal veya ektranodal tutulum görülmekle birlikte sıklıkla B semptomları eşlik etmektedir. Bu olgular; EBV negatif olgularla karşılaştırıldığında ise daha düşük performans durumuna sahiptirler (21). Tüm bu bilinen özelliklerine rağmen yaşlının EBV pozitif DBBHL'sının tamamen ayrı bir antite mi yoksa sadece DBBHL'nın bir alttipi mi olduğu ise henüz net olarak aydınlatılamamıştır (18).

Bununla birlikte; literatürde yaşlılar dışında, pediatrik hastalarda da EBV ilişkili DBBHL olgu serileri saptanmıştır (16). Bu çalışmalarda pediatrik hastalarda EBV'ün latent kalma paterninin daha kompleks olduğu ve çocuklardaki immunsupresyonla ilişkili olduğu gösterilmiştir (16).

KLİNİK ÖZELLİKLER

DBBHL’da ektranodal veya nodal tutulum görülebilmektedir. %40’ın üzerinde, en azından başlangıçta ektranodal bölgenin tutulma eğilimi vardır. Ektranodal tutulum ile başlangıç; immun sistemi baskılı hastalarda daha sık görülmektedir. En sık görülen ektranodal bölge; başta mide ve ileoçekal valv olmak üzere gastrointestinal sistem ile ilişkilidir. Bununla birlikte; kemik, testis, dalak, waldeyer halkası, tükürük bezi, tiroid, karaciğer ve adrenal bez gibi ektranodal bölgeler de tutulum alanları içerisinde sayılmaktadır.

DBBHL’larda % 11-27 arasında değişen oranlarda kemik iliği tutulumu bildirilmiştir. Kemik iliği tutulumu konkordans gösterebileceği gibi; kemik iliğinde daha düşük dereceli bir B hücreli lenfoma varlığı ile diskordans da gösterebilmektedir. Diskordan kemik iliği tutulumunun farklı yayınlarda; nadirden % 70’ e kadar değişen bildirimleri mevcuttur.

Çoğu hasta asemptomatik iken, semptomatik olduğu dönemde hastaların yarısı erken evrededir (evre I-II) ve ateş, gece terlemesi, kilo kaybı gibi B semptomları izlenmektedir. (1,13).

MORFOLOJİK ÖZELLİKLER

DBBHL’da tutulan lenf nodu veya dokular; normal yapılarını büyük lenfoid hücrelerin diffüz proliferasyonu sonucu sıklıkla tamamen, bazen de kısmi olarak kaybederler. Lenf nodunda görülen DBBHL’da sıklıkla perinodal dokuya da infiltrasyon izlenmektedir. DBBHL’lar sitolojik olarak; orta ve büyük boyutlu, sentroblast morfolojisinde, immunoblast morfolojisinde ya da bu iki morfoloji arasında kalan “intermediate” morfolojide özellikler taşıyabilir (1,7).

İMMUNOFENOTİPİK ÖZELLİKLER

DBBHL; CD19, CD20, CD22, CD79a gibi çeşitli B hücre belirleyicilerini beraber eksprese edebilse de bunlardan biri veya birden fazlasında ekspresyon kaybı olabilir (22,23). Özellikle tekrarlayan lenfoması olan veya Rituximab (anti- CD20 antikoru) tedavisi alan %60 hastada CD20 ekspresyon kaybı görülebilmektedir. Bununla birlikte DBBHL’nın özellikle

anaplastik varyantında CD30 ekspresyonu görülebilmektedir. Nadiren CD3 pozitifliği görülebilirse de genelde T hücre marker ekspresyonu yoktur. %50-75 olguda ise; yüzey immunglobulinleri ve/veya sitoplazmik immunoglobulinler saptanmaktadır (1,7,13).

Neoplastik hücrelerin %10'u CD5 eksprese ederler. CD5 pozitif DBBHL'lar siklin D1 eksprese etmemeleriyle Mantle hücreli lenfomanın blastoid varyantından ayırt edilebilirler.

Yaklaşık %50 vakada Bcl-2 ekspresyonu saptanırken, t(14;18) translokasyonu taşıyan olgularda daha fazla Bcl-2 ekspresyonu izlendiği saptanmıştır. Bunun yanı sıra Bcl-2 ekspresyonu; nodal tümörlerde ektranodal tümörlere göre daha sık olarak ekspresyon göstermektedir (2,13).

DBBHL' larda Bcl-6 ekspresyonu %60-90, IRF4 /MUM1 ekspresyonu ise %35-65 oranında görülebilmektedir. %50 vakada ise IRF4/MUM1 ve Bcl-6 koekspresyonu mevcuttur. DBBHL'da CD10; bazı kaynaklara göre %20-40, bazı kaynaklara göre ise %30-60 eksprese edilirken bu pozitiflik DBBHL'nın Germinal Hücre B hücre (GCB) ekspresyon profili gösteren alt grubunu ayırt etmede faydalı olabilmektedir (2,10,23,24).

PROGNOSTİK FAKTÖRLER:

DBBHL' larda birçok farklı prognostik faktör bildirilmiş olmakla birlikte; bu faktörlerden özellikle IPI skorunu belirleyen beş parametre ön sırada yer almaktadır (25,26).

IPI Skoru; Shipp tarafından 1993 yılında bildirilen bir skarlama sistemidir. Bu skarlama sistemi günümüzde klinisyenler tarafından en yaygın olarak kullanılan sistemlerdendir.

IPI skoru (Tablo 3); yaş, serum LDH düzeyi, ECOG performans durumu, Ann-Arbor evresi (Tablo 3) ve ektranodal tutulum varlığı kriterlerini değerlendirmektedir (25-28).

IPI skarlamasında; Her bir faktör 0 veya 1 puan ile değerlendirilmekte olup 0-1 puan arası: düşük risk, 2 puan: düşük-orta risk, 3 puan: orta-yüksek risk ve 4-5 puan ise : yüksek risk grubu olarak sınıflandırılmaktadır (Tablo 3).

Revize edilmiş IPI skorlamasında(R-IPI) ise; aynı kriterler ve puanlama sistemi geçerli olup sadece prognostik gruplar farklılık göstermektedir. R-IPI skorlamasına göre risk skoru: 0 olan hastalar: “çok iyi”, 1 ve 2 olanlar: “iyi”, 3,4 ve 5 olanlar ise: “ kötü” gidişli prognostik grup olarak sınıflandırılmışlardır.

“Çok iyi” prognostik gruptaki hastalarda % 90 uzun dönem progresyonsuz sağkalım görülmekte ve bu grup R-CHOP tedavisinden yüksek fayda görmektedir. İyi prognostik grupta sağkalım %80, kötü prognostik grupta ise sağkalım %50’lere düşmektedir.

Tablo 3: “International Prognostic Index Skoru” (IPI SKORU):

PROGNOSTİK FAKTÖRLER (HERBİRİ 1 PUAN):
YAŞ >60
SERUM LAKTAT DEHİDROGENAZ DÜZEYİ (LDH) YÜKSEKLİĞİ
DÜŞÜK ECOG PERFORMANS STATUSU
YÜKSEK EVRE(III-IV)
>1 EKSTRANODAL TUTULUM
RİSK GRUBU (STANDART IPI):
0-1:DÜŞÜK RİSK
2:DÜŞÜK-ORTA RİSK
3:ORTA-YÜKSEK RİSK
4-5:YÜKSEK RİSK
RİSK GRUBU (R- IPI):
0: ÇOK İYİ
1-2: İYİ
3-4-5: KÖTÜ

Tablo 4: ANN-ARBOR Evreleme Sistemi:

EVRE I:
-Tek lenf nodu bölgesi veya timus gibi lenfoid organ tutulumu (I)
-Tek bir ektranodal organ ya da bölgenin tutulumu (IE)
EVRE II:
-Diyaframın aynı tarafında, iki ya da daha fazla lenf nodu bölgesi (II)
-Ektranodal bir organ ya da bölgenin tutulumu (IIE)
EVRE III:
-Diyaframın her iki tarafında lenf nodu bölgelerinin tutulumu (III)
-Ektranodal organ ya da bölgenin tutulumu (IIIE)
-Ektranodal organ ve bölgenin birlikte tutulumu (IIISE)
EVRE IV:
- 1 / daha fazla ektranodal organın, lenf nodu tutulumu olsun veya olmasın diffüz veya dissemine tutulumu
A: ASEPTOMATİK
B: Ateş, terleme, vücut ağırlığının %10'undan fazla kaybı

IPI ve R-IPI skoru dışında DBBHL'da; Ann-Arbor evresine göre ileri evre hastalık, yüksek proliferasyon indeksi, Bcl-2 ekspresyon varlığı, p53 overekspresyonu, immunoblastik ve plazmoblastik morfoloji, GM dışı kökenli olması, BCL-6 gen yeniden düzenlenme yokluğu (29). ABC benzeri ekspresyon varlığı, konkordans gösteren kemik iliği tutulumu, Myc yeniden düzenlenmesi varlığı gibi birçok kötü prognostik faktör ile ilişki saptanmıştır (30,31,32).

Bununla birlikte; Rosenwald ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (33). GCB immunprofiline sahip grupta 5 yıllık sağkalım %76 olarak saptanırken ABC gen immunprofiline sahip grupta %16 olarak bulunmuş olup istatistiksel olarak anlamlıdır. Bir alt çalışma grubunda ise arasında LMO2, BCL-6, FN1, CCDN2, SCYA3 ve BCL2 olarak belirtilen 6 gen ekspresyonu tek başına sağkalımı öngörmekte etkili bulunmuştur (33). Takip eden gen profili çalışmalarında ise düşük HGAL ekspresyonu kötü prognozla (34), karşılaştırmalı

genomik hibridizasyon çalışmalarında da kromozomal bölge olan 3p11-p12 bölgesindeki kazanımların varlığı kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (35).

Bunların yanısıra DBBHL'larda; p53 mutasyonu, Siklin D3, PIM1, MYC, RhoH/TTF, PAX5 gibi bazı protoonkogenlerin hipermutasyonunu içeren genetik değışiklikler de saptanabilmektedir .Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon çalışmaları ile kromozom 1q, 2p, 3, 6p, 7, 8q, 9q, 11, 12, 13p, 16p, 18, 22q ve X'i içeren kromozom kazanımları ile 1p, 6q, 8p, and X'i içeren kromozom kayıpları da gösterilmiştir (1).

Tüm bu sayılan genetik özellikler ve prognostik faktörler göz önünde bulundurulduğunda; DBBHL'daki genetik, morfolojik ve immunohistokimyasal parametrelerin kendi içerisinde farklılık gösterdiği ve bu durumun klinik gidiş ve sağkalımda farklı etkilere sahip olduğu görülmüştür. Bu nedenle DBBHL ile ilgili günümüzde birçok araştırma yapılmaktadır ve bu parametreler tam olarak aydınlatılınca kadar da bu ve bunun gibi çalışmalar devam edecektir.

GEREÇ VE YÖNTEM:

Çalışmaya 2005-2012 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Anabilim Dalında Diffüz Büyük B hücreli Lenfoma tanısı almış 50 olguyu alındı. Bu olguların tüm kesitleri ve immunhistokimyasal boyaları tekrar gözden geçirilerek; tüm olgulara; bir kısmında tanı anında uygulanmamış olan Bcl-2, Bcl-6, CD30 ve Ki-67 immunhistokimyasal boyalar uygulandı. Kromojenik İn situ Hibridizasyon yöntemi (CISH) ile EBER (EBV RNA) varlığının değerlendirilmesi ve Floresan İn situ Hibridizasyon (FISH) yöntemiyle C-MYC translokasyonunun değerlendirilmesi için en uygun bloklar seçildi ve yöntemlere uygun kesitler hazırlandı.

Olguların demografik verilerine ise; DEÜ Hematoloji Bilim Dalındaki hasta kayıtları incelenerek ve hastane bilgi sistemi kullanılarak ulaşıldı.

Ulaşılan veriler ışığında hastaların cinsiyeti, tanı anındaki yaşları, evreleri, R-IPI skorları, LDH düzeyleri, B semptomu varlığı, tanı aldığı bölgeye ek olarak kemik iliği tutulumu olup olmadığı kaydedildi. Bunların yanısıra hastaların tedavi planları, bu tedavi planının içerisinde Rituksimab tedavisinin olup olmadığı, tedaviye yanıtları ve izlem süreleri de not edildi.

Hastalar aldıkları tedavi rejimlerine göre Rituksimab alanlar ve almayanlar olarak iki ayrı grupta sınıflandırıldı. Tedaviye yanıtları; “komplet remisyon”, “parsiyel remisyon”, “tedaviye yanıtsız” olarak değerlendirildi. Takip kaybından dolayı yanıtları değerlendiremeyen hastalar ise ; “tedavi yanıtı bilinmiyor” olarak 4. bir grup altında toplandı .

Hastaların tanı anındaki serum LDH değerleri hastanemizin referans aralık değerleri göz önünde bulundurularak normal veya yüksek olarak kaydedildi.

İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM:

- 1- Tüm olgular için; seçilen en uygun parafin bloktan lizinli lamlara 3µ kalınlığında kesitler alındı.
- 2- Kesitler etüvde gece boyunca 55 derecede bekletilerek parafinin erimesi sağlandı.
- 3- Sabah etüvden alınan kesitler, ksilolde 20 dk bekletilerek deparafinizasyon tamamlandı.
- 4- Kesitler azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi.
- 5- Kesitler distile su ile yıkandı.
- 6- Ph: 7 olan “EDTA buffer” solüsyonunda PT modülde 95 derecede 20 dk kaynatılarak ısı yardımıyla antijenin açığa çıkması sağlandı.
- 7- Kesitler oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.
- 8- Daha sonra kesitler “Tris buffer” solüsyonunda yıkandı.
- 9- % 3 lük hidrojen peroksit solüsyonunda 15 dk bekletilerek endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi.
- 10- Daha sonra kesitler “Tris buffer” solüsyonunda yıkandı.
- 11- “Ultra V block” damlatılıp 5 dk bekletilerek nonspesifik bağlanma reaksiyonları ön-
lendi.
- 12- Yıkama yapmadan lamaların üzerindeki solüsyonlar dökülerek; üzerine uygun *primer antikor damlatıldı ve 1 saat inkubasyon sağlandı ve antikorun bağlanması sağlandı.

*Primer antikor:

- CD3 (monoclonal mouse antihuman CD3, clone F7.2.38, Dako)
- CD20 (mooclonal Mouse antihuman CD20, clone L26, Dako)
- BCL-2 (monoclonal Mouse antihuman BCL-2 oncoprotein, clone 124, Dako)
- BCL-6(monoclonal Mouse antihuman BCL-6 protein, clone PG-B6p, Dako)

-Kİ-67(monoclonal Mouse antihuman Ki-67 antigen, clone MIB-1, Dako)

- 13- Daha sonra kesitler “Tris buffer” solüsyonunda yıkandı.
- 14- Biotin damlatılarak oda sıcaklığında 10 dk inkübasyon sağlandı.
- 15- Daha sonra kesitler “Tris buffer” solüsyonunda yıkandı.
- 16- Streptavidin damlatılarak oda sıcaklığında 10 dk inkübasyon sağlandı.
- 17- Daha sonra kesitler “Tris buffer” solüsyonunda 20 dk bekletildi.
- 18- 1ml substrata ve 1 damla kromojen eklenerek (1:1) DAP solüsyonu hazırlandı. Her kesite 2 damla hazırlanan DAP solüsyonundan damlatılarak oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
- 19- Ardından yaya alınan kesitler çeşme suyunda yıkandı.
- 20- Mayer’s hematoksilende yaklaşık 1dk bekletilerek kontrast boyanma sağlandı.
- 21- Ardından kesitler çeşme suyunda yıkandı.
- 22- Yükselen alkol serilerinde her birinde 2 dk bekletilerek geçirilen kesitler daha sonra 10 dk ksilolde bekletildi.
- 23- Son olarak ise kesitler entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

ÇALIŞMAMIZDA KULLANILAN İMMUNOHİSTOKİMYASAL BELİRLEYİCİLERİN ÖZELLİKLERİ

BCL-2:

Bcl-2; 18. kromozom üzerinde yerleşen bir insan protoonkogenidir. Aynı isimle adlandırılan Bcl-2 ürünü ise endoplasmik retikulum membranında, nükleer membranda ve dış mitokondrial membranda yerleşim göstermektedir.

İnsanda en az 17 adet bcl-2 aile üyesi mevcuttur. Bcl-2 ile ilgili proteinler; Bcl-2, Bax ve Bik olmak üzere 3 ana grup altında toplanabilmektedir (36-38).

Bu gen; ilk kez 1985 yılında t(14;18)(q32;q21) translokasyon bölgesinde bulunması ile keşfedilmiştir. Bu translokasyon; DBBHL'lar ve foliküler lenfomalar gibi B hücreli lenfomalarda bulunmaktadır. DBBHL'larda Bcl-2 protein ekspresyonu t(14;18)(q32;q21) translokasyonunu taşıyan türlerin yanı sıra; bu translokasyonun yokluğunda, 18q21 amplifikasyonu ve/veya (NF-κB) yolağı aktivasyonu ile de gelişebilir (39,41,42).

Antiapoptotik bir molekül olan Bcl-2 proteini aktive olmayan B ve T hücrelerde eksprese edilirken normal germinal merkezde eksprese edilmezler (43). DBBHL'larda Bcl-2 proteini %22-80 oranında eksprese edilirken, ekspresyonu; sıklıkla kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (43).

R-CHOP tedavisi alan hastalarda, Bcl-2 proteininin prognozla ilişkisi net değerlendirilememektedir. Bunun nedeni Rituksimab kullanımının Bcl-2 pozitif hastalarda sağkalımı artırıyor olmasındandır (39,44). Bu durum; Bcl-2 pozitifliğinin kötü prognostik faktör sayılmasına rağmen avantaj olarak görülmesine neden olabilmektedir (39).

BCL-6:

BCL-6 geni 3q27'de lokalize olan, germinal merkez B hücrelerinde eksprese edilen spesifik (zinc-finger) bir transkripsiyonel reseptördür (45). Germinal merkez formasyonunda, lenfosit fonksiyonlarında, diferansiyasyonda ve sağkalımda rol oynamaktadır. Germinal merkez B hücre kökenli hücrelerdeki p53'ü suprese edip apoptozu inhibe etmektedir (46). DBBHL'da BCL-6 translokasyonu ya da hipermutasyonu görülebilmekteyken translokasyon daha sık saptanmaktadır ve sıklıkla IG ağır zinciri (IgH) ile ilişkilidir (4). Bcl-6 (IgH)

translokasyonu DBBHL’da %20-30 civarında görülmektedir ve iyi prognoz ile ilişkili bulunmuştur (4, 45).

Bununla birlikte Rituksimab kullanımı BCL-2 nin tersine BCL6 negatif olgularda daha etkili bulunmuştur. Sonuç olarak Rituksimab kullanımı yüksek riskli DBBHL grubunda daha faydalı bulunmuştur. Bu durumun aydınlatılması için ise daha ileri çalışmalara gereksinim vardır (2, 47,48).

Kİ-67:

Ki 67; ekspresyonu direk olarak hücre proliferasyonu ile ilişkili olan nukleer ve nukleoler bir proteindir (49,50). Ki 67 proteini; hücre siklusunun G1, S, G2, M gibi tüm aktif fazlarında saptanabilirken; G0 evresi olan dinlenme fazında ise bulunmamaktadır. Bu durum ise anti- Ki 67 protein antikoru olan MIB-1’in mükemmel bir proliferasyon göstergesi oluşunu açıklamaktadır (49). Ki 67 proteini sayesinde hücre popülasyonunun büyüyen kısmını belirlemek mümkün olmaktadır. Ki 67 değerlendirilmesinin DBBHL’ da tanısal bir önemi olmamakla birlikte bağımsız bir prognostik belirteç olarak görülmektedir (51). Ki 67 pozitif tümör fraksiyonunun değeri (Ki 67 proliferasyon indeksi) sıklıkla klinik gidiş ile korelasyon göstermektedir (49). DBBHL’ da Ki-67 proliferasyon indeksi genelde yüksektir ve %40 üzerinde saptanmaktadır. Bununla birlikte bazı olgularda %90 üzerinde ki-67 proliferasyon indeksi bildirilmiştir. Literatürde özellikle ki-67 proliferasyon indeksi %80’in üzerinde olan olgularda prognozun kötü olduğunu destekleyen birçok çalışma bulunmaktadır.

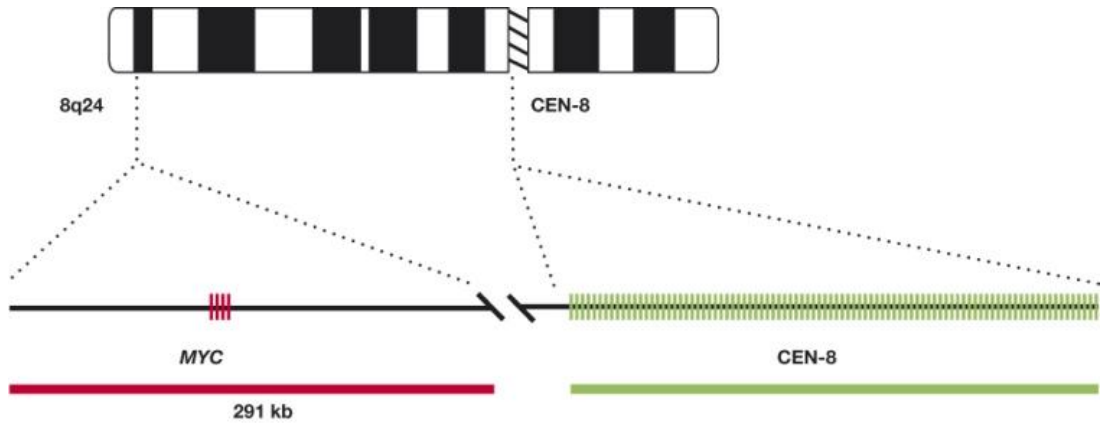
İN SİTU HİBRİDİZASYON:

KROMOJENİK İN SİTU HİBRİDİZASYON (CISH) VE FLORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON (FISH):

İnsitu hibridizasyon (ISH); hücrelerde veya dokulardaki spesifik gen ürünlerini ortaya çıkarmak için kullanılan bir tekniktir. Tamamlayıcı DNA veya RNA (cDNA, cRNA)'nın saptanması için uygulanmaktadır.

ISH; kromozomlar, hücreler veya doku kesitlerinde nükleik asit dizilerinin saptanmasını çift iplikçikli nükleik asit oluşumu temeline dayanarak sağlamaktadır. Tamamlayıcı DNA veya RNA; sitolojik materyallerde ve doku kesitlerinde bir DNA veya RNA probu kullanılarak kolorimetrik veya metalografik teknikler ile görüntülenmektedir. Bu yöntemle gen ekspresyon paterninin belirlenmesi aynı zamanda gen fonksiyonu ile ilgili de bilgi verebilmektedir. İşaretleyici prob; floresan bir madde ise immunfloresan mikroskopi ile tespit edilebilir ve yöntem Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) olarak adlandırılmaktadır.

Biz çalışmamızda olgularımızda C-myc yeniden düzenlenmesinin var olup olmadığını FISH yöntemiyle değerlendirdik. Myc geni Kromozom 8q24 üzerinde yer almakta ve yaklaşık olarak 5kb ağırlığında olup 3 ekson içermektedir. FISH yönteminde kullandığımız Myc/Cen-8 FISH prob-miks; kromozom 8 sentromer bölgesini referans olarak kullanarak myc genlerinin kopya sayısını tespit etmektedir. Myc/Cen-8 FISH prob-miks; kromozom 8'in sentromerik bölgesini hedef alan, myc bölgesini saran 291 kb Texas-red-işaretli DNA probunu içermekte olup; PNA ile DNA teknolojisini bir araya getirmektedir (54).



Şekil 2: Myc/Cen-8 FISH DNA Prob-miks (Dako, Y5504) Şematik görünümü (54).

İşaretleyici probun bu yöntemde olduğu gibi floresan bir madde değil de bir boya maddesi olduğu durumda ise yöntem Kromojenik Insitu Hibridizasyon (CISH) olarak adlandırılmakta ve değerlendirme ışık mikroskopi altında yapılmaktadır (52,53). ISH ile aynı zamanda viral, bakteriyel ve fungal organizmaların morfolojik olarak tespit edilebilmesi özelliğinden faydalanarak biz de çalışmamızda EBERs (EBV-encoded small nuclear early regions) (EBV RNA) varlığını saptamak için CISH yöntemini kullandık. Bu yöntem literatürde belirtilen diğer yöntemler olan PCR yöntemiyle EBV ekspresyonu veya immunhistokimyasal (IHK) yöntem ile EBV latent membran proteinin saptanmasına göre daha geçerli ve daha ideal bir yöntemdir.

CISH YÖNTEMİ:

- Çalışmamızda CISH yöntemi için “PNA ISH Detection (Dako, kod no: K 5201) kiti kullanıldı.
- İşlemler 1 günde tamamlandı ve şu basamaklar sırasıyla takip edildi:
- Formalin fikse parafine gömülü bloklardan standart olarak poly-1-lizinli lamlara 5 µm kalınlıkta kesitler hazırlandı.
- Kesitler etüvde 50 derecede 60 dakika bekletilerek parafin eritildi.
- Daha sonra kesitler oda sıcaklığına getirildi.

1-REHİDRATASYON AŞAMASI:

- Kesitler, deparafinizasyon için 2x3 dk ksilde bekletilerek parafinden arındırıldı.
- %99 Etanolde 2x3 dk bekletildi.
- %95 Etanolde 2x3 dk bekletildi.
- Distile suda 3 dk bekletildi.
- İşlemler sonrasında dokunun daha kolay değerlendirilmesi için “Dakocytomation Kalemi” ile dokunun çevresi çerçevesi.
- Distile suda 2x3 dk bekletildi.

2- ÖN İŞLEM “PRE-TREATMENT” AŞAMASI:

- Kesitler steril eldiven ve maske kullanılarak “humidity chamber”a alındı.
- Tüm kesitlere TBS (Tris/Hcl (ph:7.5): Tris Buffer) tampon solüsyonu ile 1:10 oranında dilüe edilen 150 µl proteinaz K damlatıldı ve oda sıcaklığında 30 dk inkubasyona bırakılarak proteolitik enzim sindirimi sağlandı.
- 2x3 dk distile suda bekletildi.
- %95 etanole 10 saniye daldırıldı.
- Kesitler yaklaşık 5 dk kadar oda sıcaklığında “humidity chamber”da bırakıldı.

3-HİBRİDİZASYON AŞAMASI:

- Kesitlere 1-2 damla Floresan konjuge-Epstein-Barr (EBER) Peptid Nukleik Asit (PNA) probu uygulandı (DAKO code- Nr.Y 5200).
- Bu aşamada üretici firma ve literatürdeki kaynaklarda önerildiği şekilde her grup olgu için pozitif ve negatif kontrol de beraberinde çalışıldı.
- Kesitlerin üzeri lamel ile kapatıldı ve kenarları silikonlandı.
- Kesitler Hibridizer’ da “kappa” programına yerleştirildi ve 1 ½ saat 55 derecede inkübe edildi.
- PNA kiti içerisinde yer alan “stringent wash” solüsyonu 1:60 oranında TBS ile dilüe edilerek hazırlandı.
- Solüsyon 2 ayrı kaba ayrıldı. Biri oda sıcaklığında bırakıldı. Diğeri su banyosunda 55 dereceye ısıtıldı.
- Oda sıcaklığında hazırlanan “Stringent wash” solüsyonuna silikonlarından arındırılan lamalar lamelleriyle beraber 1-2 dk bırakılarak lamellerin dokuya zarar vermeden ayrılması sağlandı.
- Lamellerinden ayrılan kesitler 55 dereceye ısıtılan “Stringent wash” solüsyonuna 25 dakika bırakıldı.
- Su banyosundan çıkarılan kesitler TBS ile 10 saniye yıkandı.

4- BELİRLEME/TESPİT AŞAMASI:

- Kesitler “humidity chamber”a alınarak her birinin üzerine 2-5 damla Floresana karşı alkalın fosfataz ile konjuge antikör (anti-FITC/AP) ile 30 dk inkübe edildi.

- Kesitler, TBS ile 2x3 dk yıkandı.
- Distile suda 2x1 dk yıkandı.
- Substrat damlatılarak 45 dk inkübe edildi.
- Distile su ile 5 dk yıkandı.
- Aqua hematoxilen ile 5-10 sn inkübe edildi.
- Kesitler yükselen alkol serilerinden (%70- %85 -%95 - %99) geçirildi.
- -Son olarak da distile su ile yıkanan kesitler lamel ile kapatılarak işlem sonlandırıldı.

5- IM İLE DEĞERLENDİRME:

- Sağlıklı sonuç almak için lamel ile kapatıldıktan sonra en az 30 dk bekletilen slaytlar ışık mikroskop altında değerlendirildi.
- Koyu mavi/ siyah renkli nükleer boyanma gösteren hücreler pozitif olarak değerlendirildi.

ÇALIŞMAMIZDA CISH YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLEN: EBER (EBV RNA):

EBV; Herpes virüs ailesinin bir üyesidir. Diğer herpesvirüsler gibi EBV de zarflı bir virüstür ve ikozahedral bir kapsül ile sarılı DNA koru içeren tüm dünyada endemik olan bir virüstür. EBV; dünyadaki erişkinlerin %90'ını enfekte etmektedir (55,56). Bir kez enfekte olan kişi tüm hayatı boyunca virüsü taşımaktadır. EBV; Batı toplumlarında 5 yaşındaki çocukların yaklaşık %50 sinde, erişkinlerin ise %90-95'inde serolojik olarak saptanabilmektedir.

EBV'ü tespit etmek için kullanılan 3 yöntem vardır. Bunlar; başta in situ hibridizasyon (ISH) olmak üzere PCR ve immunhistokimyasal (IHK) yöntemlerdir.

ISH; EBER RNA tespit edilmesi için önerilen ideal yöntemdir (55). PCR ve CISH yöntemleri EBV RNA tespitinde birbirine yakın sensitivite görülse de immunhistokimyasal teknik EBV'ü saptamada bu iki yöntem kadar sensitif değildir. CISH için; PCR yöntemine göre daha büyük dokuya ihtiyaç olsa da aynı zamanda bu yöntemde enfekte hücre tipinin de belirlenebilmesi avantajdır (55,57).

EBV; başta enfeksiyöz mononükleoz olmak üzere; Burkitt lenfomanın, birçok lenfoproliferatif hastalığın, klasik Hodgkin lenfomanın, DBBHL'nın, lenfomatoid

granulomatozisin, SSS' nin HIV ilişkili lenfomalarının ve nazofaringeal kanser gibi bazı epitelyal kanserlerin etyolojilerinde rol oynayabilmektedir (58).

DBBHL; nadir olarak Epstein-Barr virus (EBV) ile ilişkili bulunmakla birlikte eğer görülürse sıklıkla anaplastik ve plazmoblastik varyantta veya daha yaşlı hastalarda saptanmaktadır. Bunun yanı sıra immunsuprese hastalarda da EBV ile çok kuvvetli birliktelik görülmektedir.

FISH YÖNTEMİ:

- Çalışmamızda FISH yöntemi için “Histology FISH Accessory Kit (Dako, kod no: K 5599) kullanıldı.
- İşlemler 2 günde tamamlandı ve şu basamaklar sırasıyla takip edildi:
- Formalin fikse parafine gömülü bloklardan standart olarak poly-l-lizinli lamlara 3 µm kalınlıkta kesitler hazırlandı.
- Kesitler etüvde 60 derecede 45 dakika (literatürde belirtilen süre: 30-60dk) bekletilerek parafin eritildi.
- Daha sonra kesitler oda sıcaklığına getirildi.

FISH 1. GÜN:

1-DEPARAFİNİZASYON VE REHİDRATASYON AŞAMASI:

- Kesitler, deparafinizasyon için 2x5 dk ksilde bekletilerek parafinden arındırıldı.
- %96 Etanolde 2x 2dk bekletildi.
- %70 etanolde 2x2dk bekletildi.
- Distile suda 2 dk bekletildi.

2- ÖN İŞLEM “PRE-TREATMENT” AŞAMASI:

- Kesitler 1:20 oranında distile su ile dilüe edilen Ön işlem solüsyonu (Pre-treatment solüsyonu) su banyosu içerisinde 95-99 dereceye kadar ısıtıldı.
- Solüsyonun sıcaklığı termometre vasıtasıyla ölçülerek sıcaklıktan emin olduğunda kesitler su banyosu içerisindeki ısıtılmış ön işlem solüsyonuna alındı ve 10 dk inkübe edildi.

- Kesitler su banyosundan çıkarılarak; 15 dk oda sıcaklığına soğutuldu.
- Kesitler 1:20 oranında distile su ile dilüe edilen yıkama tampon “Wash Buffer” solüsyonu içerisinde 2x3 dk oda sıcaklığında yıkandı.

3- PEPSİN SİNDİRİMİ AŞAMASI:

- Fazlalık “wash buffer” tampon solüsyonu kesitler üzerinden temizlendi.
- Kesitlere 5 damla (literatürde 5-8 damla: 250 µl), 2-8 derecede saklanmış kullanılacağı sırada buzdolabından çıkartılmış pepsin damlatıldı.
- Kesitler 37 dereceye ısıtılmış hibridizer’a konularak 5 dk (literatürde: 3-6 dk) inkübe edildi.
- Kesitler oda sıcaklığında 1:20 oranında dilüe edilmiş “wash buffer” tampon solüsyonunda 2x3 dk yıkandı.

4- DEHİDRATASYON AŞAMASI:

- Kesitler tampon solüsyonunda yıkandıktan sonra artan alkol serilerinde (%70-%85-%96 etanol) 2x2 dk dehidrate edildi.
- Dehidrate kesitler dik pozisyonda havada 20 dk. kurumaya bırakıldı.
- Bu ve sonraki adımlarda lamaların kuvvetli ışıkla temasından sakınıldı.

5- PROBUN EKLENME AŞAMASI:

- Kurutulan kesitlerin merkezine, tüm dokuya teması sağlanarak 10µl Probe-mix (MYC/CEN-8 FISH probe mix Dako kod no: Y5504) damlatılarak üzerleri 22x22 mm boyutlarda lamelle, arada hava kabarcığı kalmamasına özen gösterilerek kapatıldı ve lamellerin çevresi silikonlandı.

6- HİBRİDİZERDA (DAKO HİBRİDİZER) DENATÜRASYON VE HİBRİDİZASYON AŞAMASI:

- Kesitler Hibridizer’a literatürde ve üretici firma tarafından önerilen protokole uygun olarak 82 derecede 5 dk denatürasyon ve ardından 45 derecede geceboyu (16 saat) hibridizasyon programına koyuldu.
- Hibridizera kesitlerin yanı sıra 2 adet distile su ile ıslatılmış humidity kontrol stripi konarak ortamın nemli kalması sağlandı ve program başlatıldı.

FISH 2. GÜN:

7- “STRINGENT WASH” AŞAMASI:

- İki ayrı kapta 1:20 oranında distile su ile dilüe edilen “Stringency buffer” solüsyonu hazırlandı.
- Kesitler oda sıcaklığındaki “Stringency buffer” solüsyonu içerisine konuldu.
- Aynı zamanda 2.” Stringency buffer” solüsyonu önceden 65 dereceye getirilen su banyosu içerisine konuldu.
- Oda sıcaklığındaki “ Stringency buffer” da bekletilen kesitler nazıkçe lamellerinden ayrılarak termometre ile tekrar ölçüm yapılarak 65 derece olduğundan emin olunan su banyosundaki “Stringency buffer” içerisine geçirildi ve 10 dakika bekletildi.
- Su banyosundan alınan kesitler distile su ile 1:20 oranında dilüe edilen “wash buffer” solüsyonu içerisinde 2x3 dk bırakıldı.
- İşlemler sonrasında dokunun daha kolay değerlendirilmesi için “Dakocytomation Kalem” ile dokunun sınırları çerçevesi.

8- DEHİDRATASYON AŞAMASI:

- Kesitler artan alkol serilerinde (%70-%85-%96 etanol sırasıyla) 2x2 dk bekletilerek dehidrate edildi.

9-KAPAMA AŞAMASI:

- Alkol serilerinden geçirilen kesitler direk ışık temasından kaçınılarak havada dik pozisyonda 15-20 dk kurutuldu.
- Tam olarak kurutulan kesitlere dokunun tümüne temas edecek şekilde 15µl “Floresan mounting medium” damlatıldı.
- Lamalar 2-8 derece olan buzdolabı sıcaklığında en az 15 dk tam karanlıkta kurumaya bırakıldı.

10-DEĞERLENDİRME AŞAMASI (FISH SKORLAMASI):

- Kesitler Texas Red/FITC double filter’a sahip 100 W lambası olan floresan mikroskop altında 100 lük büyütmede immersiyon yağı kullanılarak literatürde daha önce bildirilen yöntemler kullanılarak değerlendirildi (54).

- Bu yöntemle; Myc bölgesini tamamen kaplayan Texas-red işaretli DNA probu ile kromozom 8'in sentromerik bölgesini hedef alan floresan işaretli PNA probu değerlendirildi.

Floresan mikroskop altında Texas red işaretli DNA probu hedef bölgesi "myc" genine bağlanarak, kırmızı sinyal vermektedir. Floresan işaretli PNA probu hedef bölgesi ise (CEN-8) Kromozom 8 in sentromerik bölgesine bağlanıp yeşil floresan sinyal vermektedir.

Biz Texas Red/FITC double filter'a sahip floresan mikroskopik değerlendirmemizde bu iki hedef bölgeye spesifik hibridizasyon sonucu her myc geni için bir kırmızı floresan sinyal ve her kromozom 8 in sentromerik bölgesi için ayrı olarak izlenen bir yeşil floresan sinyal ortaya çıktığını gördük.

FISH skorlamasını yaparken; literatürde belirtilen "cut-off" değerleri dikkate aldık. Sıklıkla kullanılan cut-off değer olan %5'i skorlama sırasında pozitif değer olarak kabul ettik. (Sayılan 100 hücreden 5 tanesinde translokasyon varlığı) (59).

"Split signal" yöntemine dayanan bu değerlendirmede normal sinyallerin de birbirinden hafif olarak uzak ortaya çıkabildiğini gördük. Bu yüzden sinyaller arasındaki mesafeleri dikkatlice değerlendirdik ve literatürde belirtilen "cut-off" mesafe ölçümlerini dikkate aldık.

Fiksasyonun iyi olmadığı, nükleus sınırlarının net olarak değerlendirilemediği, sinyallerde üst üste binme "overlapping" olan alanları değerlendirme dışı bıraktık.

Literatürde belirtilen değerlendirme yöntemleri esas alınarak;

A- Sarı renk floresan sinyal varlığında (üst üste gelen kırmızı ve yeşil floresan sinyal)

B- Yeşil ve kırmızı floresan sinyalin bitişik görülmesi durumunda

C- Kırmızı ve yeşil sinyal arasındaki mesafenin bir sinyalin büyüklüğünün 2 katından az olması durumunda hücrenin normal diploid bir hücre olduğunu kabul ederek bu olguları c-myc translokasyonu izlenmeyen negatif olgular olarak sınıflandırdık.

D- Kırmızı ve yeşil sinyal arasındaki mesafenin bir sinyalin büyüklüğünün 2 katı ve fazlası olması durumunda ise (break apart) (split signal) hücreleri anormal diploid hücre ola-

rak kabul ederek bu olguları pozitif (split sinyal ile c-myc translokasyonu varolan olgular) olarak değerlendirdik (60).

FISH YÖNTEMİYLE DEĞERLENDİRİLEN C-MYC:

C-myc yeniden düzenlenmesi; Burkitt lenfomanın yanısıra t(8,14) translokasyonu veya 8q24 gen amplifikasyonu sonucu yaklaşık %15 DBBHL hastasında overeksprese edilmektedir (5, 61). C-myc, hücre siklusu progresyonunu sağlayacak bazı genleri aktive ederken (Siklin D1, D2 ve CDK4 gibi) aynı zamanda bazı inhibitör proteinleri (p21CIP1 ve p27KIP1) de inhibe eder. Bununla birlikte farklı yollardan apoptozisi de aktive etmektedir. c-MYC yeniden düzenlenmesi daha sık olarak ekstrasnodal tutulumlu DBBHL veya HIV pozitif hastalarda görülmektedir (4,5,62). Her zaman olmasa da, c-myc yeniden düzenlenmesi genellikle agresif klinik gidiş ile ilişkili bulunmuştur (4,5,63).

Bununla birlikte “myc” yeniden düzenlenmesi ile eş zamanlı olarak IGH-BCL2 yeniden düzenlenmesi gösteren ayrı bir B hücreli lenfoma grubu ortaya çıkmaktadır. Bu farklı grup; “Double Hit (dual hit)” Lenfomalar (DHL) olarak adlandırılmaktadır. Aynı zamanda daha nadir olarak görülse de myc yeniden düzenlenmesi ile birlikte BCL6 pozitifliği veya siklin D1 pozitifliği gösteren olgular da bu isim altında toplanmaktadır (64). Daha nadir olarak myc yeniden düzenlenmesi ile beraber hem BCL2 hem BCL6 pozitifliği gösteren ayrı bir grup ise “Triple-hit lenfomalar” (THL) adı altında toplanmaktadır (64).

Morfolojik ve immunfenotipik spektrumlarından dolayı DHL ‘ların tanınması ve sınıflandırılması zorluk yaratmaktadır (65). Bu olgular genelde “DBBHL ve BL özellikleri arasında kalan başka türlü sınıflandırılmayan B-hücreli lenfomalar” grubu altında sınıflandırılmışlardır (65,66).

İSTATİSTİKSEL ANALİZ:

Çalışmamızda elde edilen veriler, SPSS-15 (Statistical Package For Social Sciences) programında oluşturulan veri tabanına girildi, verilerin istatistiksel analizleri yine aynı program ile yapıldı. Sürekli değişkenlerin ve alt gruplarına ait, ortalama, standart sapma, medyan, min ve max değerleri sunuldu.

Sınıfsal değişkenler çapraz tablolar şeklinde frekans ve yüzdeler halinde hazırlandı ve gruplar arası dağılımlar ki-kare test yöntemleri ile karşılaştırıldı. Çapraz tablolara ait frekans dağılımları ise bar grafikleri ile sunuldu.

Sağkalım araştırmalarında Kaplan-Meier sağkalım analiz yöntemi kullanılıp, Sağkalım karşılaştırmaları log rank testi ile yapıldı.

Tüm testlerde 1. tip hata payı $\alpha:0,05$ olarak belirlendi ve çift yönlü olarak test edildi, "p" değerinin 0.05'ten küçük olması durumunda gruplar arası fark, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

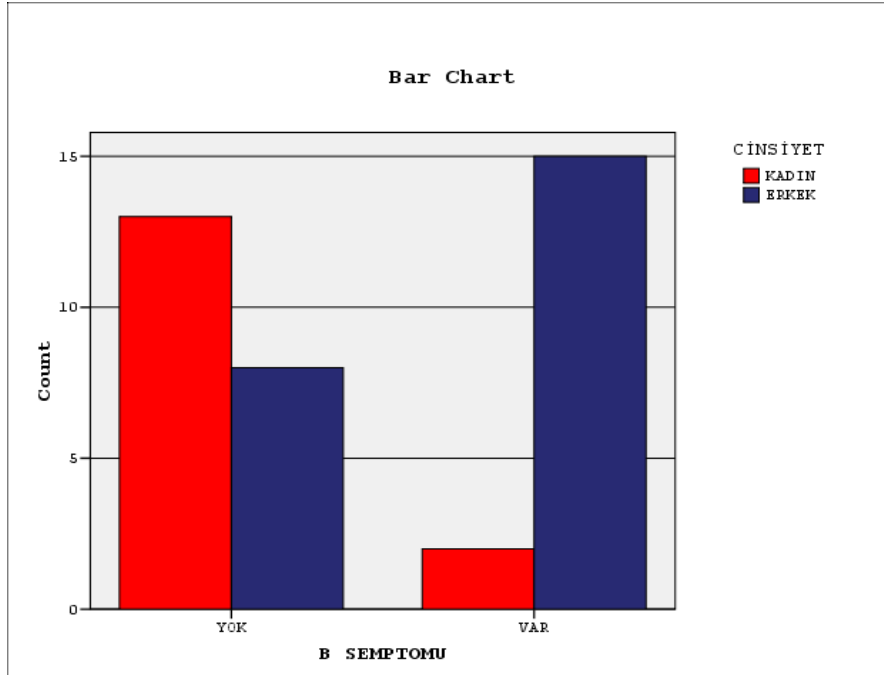
BULGULAR:

Çalışmaya alınan 50 olgunun 22'si kadın (%44), 28'i (%56) ise erkekti. Erkek olguların yaş aralıkları 18 ile 77 arasında değişmekte iken ortalama yaş aralığı: 55.96 idi. Kadınların yaş aralığı ise 19 ile 78 arasında değişmekte iken ortalama yaş aralığı: 55.86 idi. Tüm olgularda ise ortalama yaş aralığı 55.92 idi.

Literatürdeki verilere göre hasta yaşı; IPI skoru belirlenirken kullanılan prognostik faktörlerden biridir. Bu bilgilerin ışığında hastanın yaşının 60 üzeri veya 60 ve altı olması değerlidir. Biz olgularımızı bu prognostik faktöre göre sınıflandırdığımızda; hastaların 24'ünün (%48) ≤ 60 yaş iken 26'sının (%52) >60 yaş olduğunu belirlendi.

Serum Laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyi; hastanemiz kayıtlarına göre tarandığında ve hastanemiz referans aralıkları göz önünde bulundurulduğunda 18 hastada (%36) normal, 32 hastada (% 64) ise yüksek olarak tespit edildi.

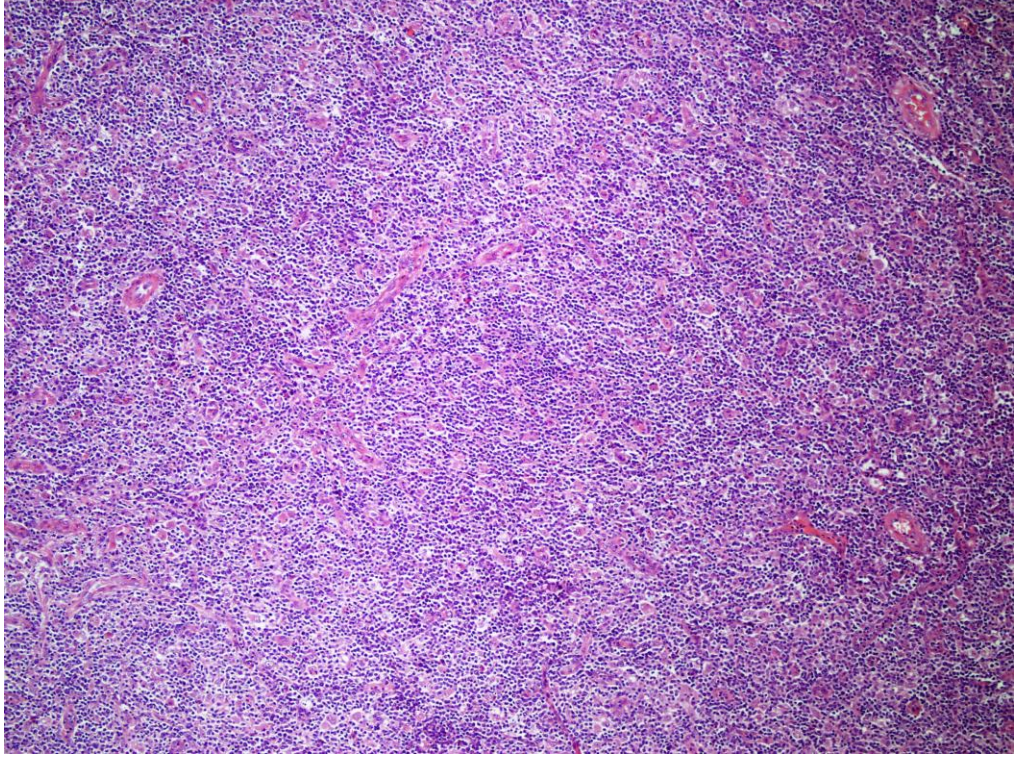
Hastaların klinik bulguları değerlendirildiğinde 21 hastada (%42) B semptomları mevcutken, 17 hastada(%34) B semptomları izlenmedi. B semptomu görülen 17 DBBHL hastasından 15'i (%88.2) erkek 2'si (%11.8) kadın idi. Bu sonuçlara göre; erkeklerde daha sık görülüyor olması istatistiksel olarak sınırda anlamlıydı (Grafik 1) ($p=0.005$).



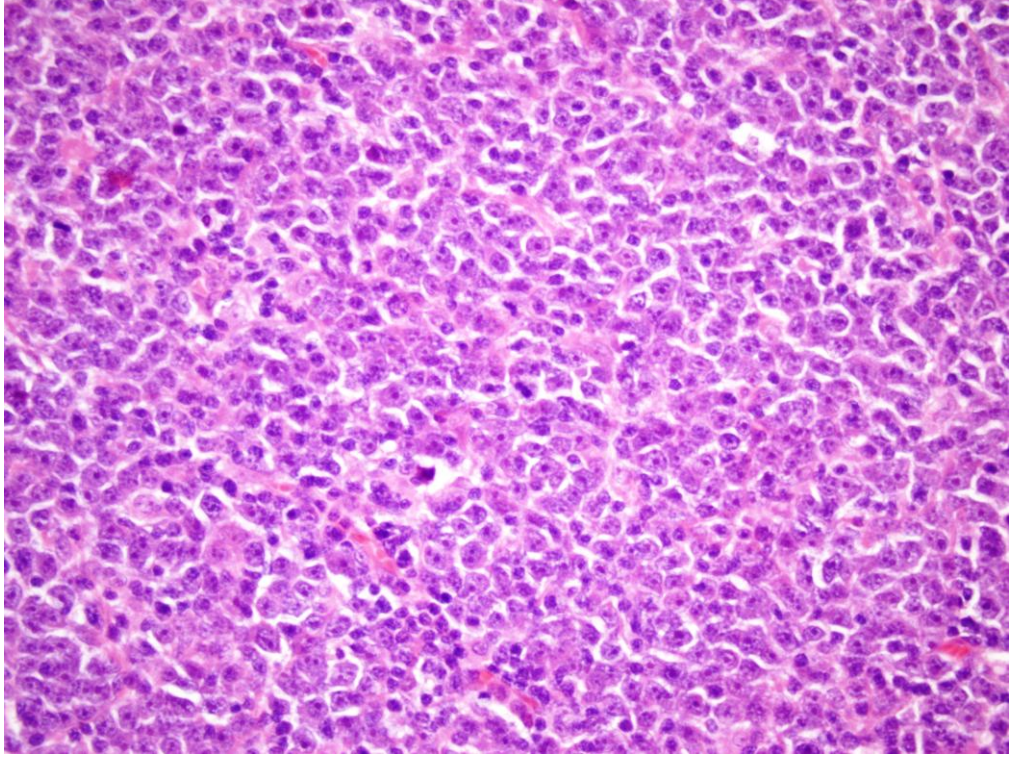
Grafik 1: B semptomu varlığı - cinsiyet ilişkisi

Olguların 35'inde (%70) tanı aldığı tutulum alanı lenf nodu bölgesi iken, 15 'inde (%30) tanı anındaki tutulum alanı ektranodal bir bölge idi. Ektranodal tutulumu olan 15 olgudan; 3'ü tonsilden, 3'ü yumuşak doku kitlesinden, 3'ü mediastinel kitleden, 2'si dalaktan, 2'si deri ve deri altı yağ doku kitlesinden, 1'i kas içi kitleden, 1'i testisten, 1'i ise pankreas dokusundan tanı almıştı.

Olgularımızın 37'si (%74) DBBHL “başka türlü adlandırılmayan” sınıfı altında, 7'si (%14) DBBHL “anaplastik varyant”, 2'si (%4) DBBHL “T hücre/histiositten zengin varyant”, 1'i(%2) ALK pozitif DBBHL, 1'i(%2) Burkitt-like BBHL, 1'i (%2) CD30 pozitif Anaplastik varyant, 1'i (%2) ise yaşlıların EBV pozitif DBBHL'sı olarak değerlendirildi.



Resim 1: Diffüz Büyük B hücreli lenfoma. Hematoksilen-Eozin X100

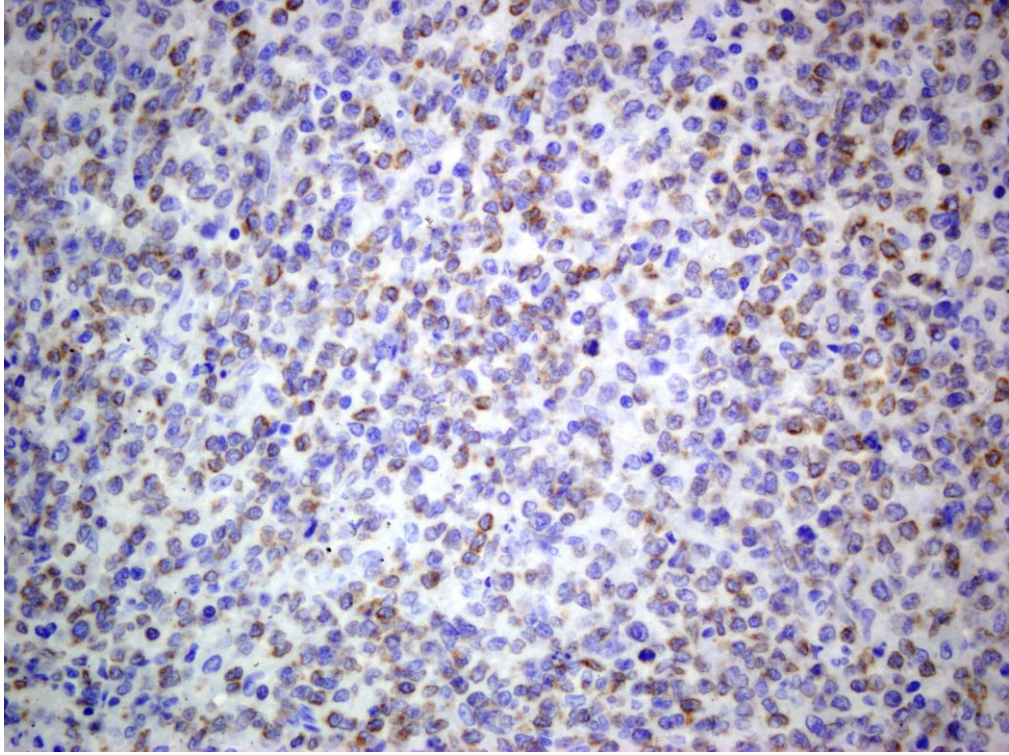


Resim 2: Diffüz Büyük B hücreli lenfoma. Hematoksilen-Eozin X400

Olgulardan 10'unda (%20) kemik iliği tutulumu mevcutken, 40'ında (%80) kemik iliği tutulumu saptanmadı. Kemik iliği tutulumu olan olguların 3'ünde kemik iliğinde diskordans görülmekte olup daha düşük dereceli bir lenfoma olan Kronik lenfositik lösemi /Küçük lenfositik lenfoma (SLL/KLL) tutulumu mevcuttu. Kemik iliği tutulumu olan diğer 7 olguda ise kemik iliği tutulumu konkordans göstermekte olup kemik iliğinde de DBBHL tutulumu izlenmekteydi.

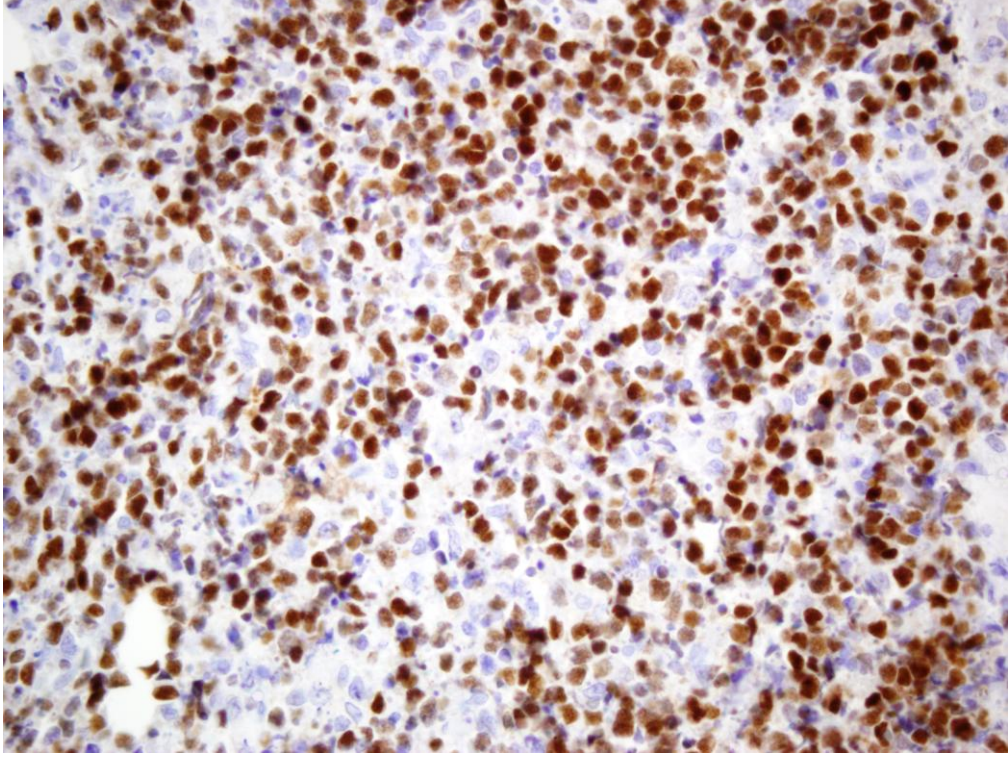
İmmunohistokimyasal olarak;

Çalışmamızda 50 olgudan 26'sı (%52) BCL-2 ile olumlu boyanma gösterirken; 24 olguda (%48) BCL-2 ile boyanma saptanmadı.



Resim 3: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada sitoplazmik Bcl-2 immunreaktivitesi.
(X400)

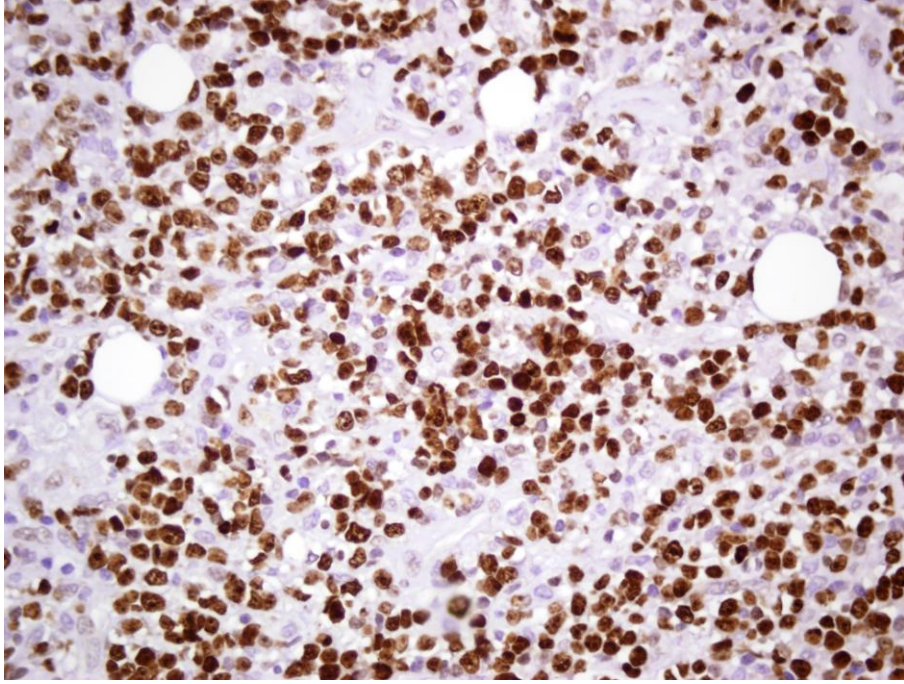
Bcl-6 ile 50 olgudan 27 'sinde (%54) olumlu boyanma görülürken, geriye kalan 23 olguda (%46) olumlu boyanma saptanmadı.



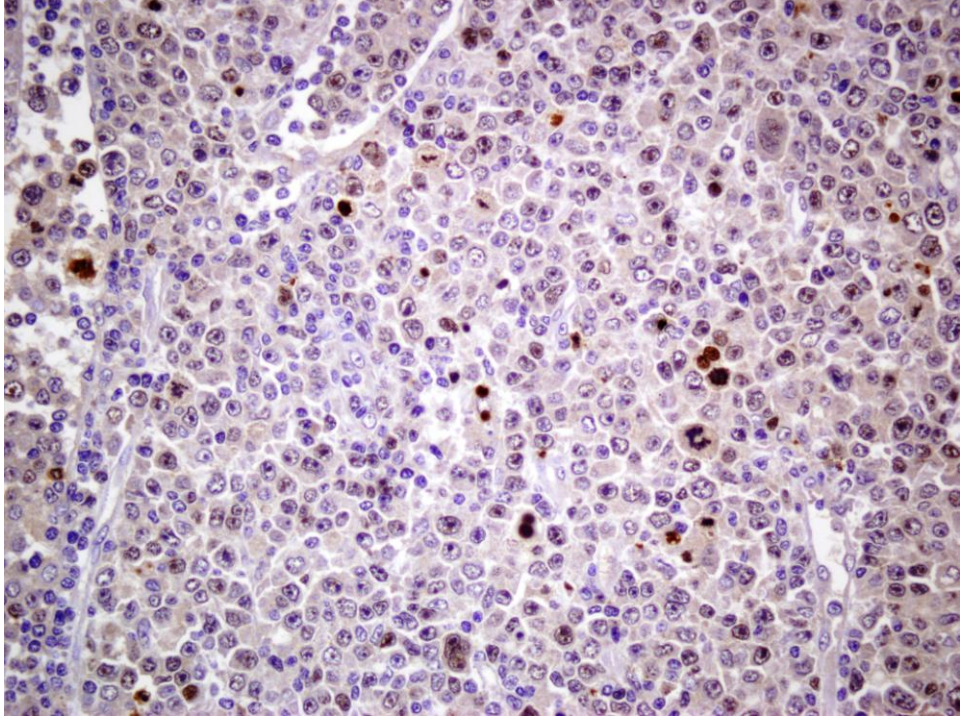
Resim 4: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada nükleer Bcl-6 immunreaktivitesi.
(X400)

Ki-67 proliferasyon indeksi; 9 (%18) olguda %25'in altında, 8 (%16) olguda %26-49, 9 (%18) olguda ise %50-74 olarak saptanırken 24 olguda %75 ve üzeri olarak değerlendirildi.

Bu olguların ki-67 proliferasyon indeksleri düşük proliferasyon ve yüksek proliferasyon indeksi olarak 2 grupta sınıflandırıldığında 17 olguda (%34) $< \%50$; 33 olguda (%66) $\geq \%50$ olarak değerlendirildi.



Resim 5A: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada yüksek nükleer Kİ-67 immunreaktivi tesi. (X400)

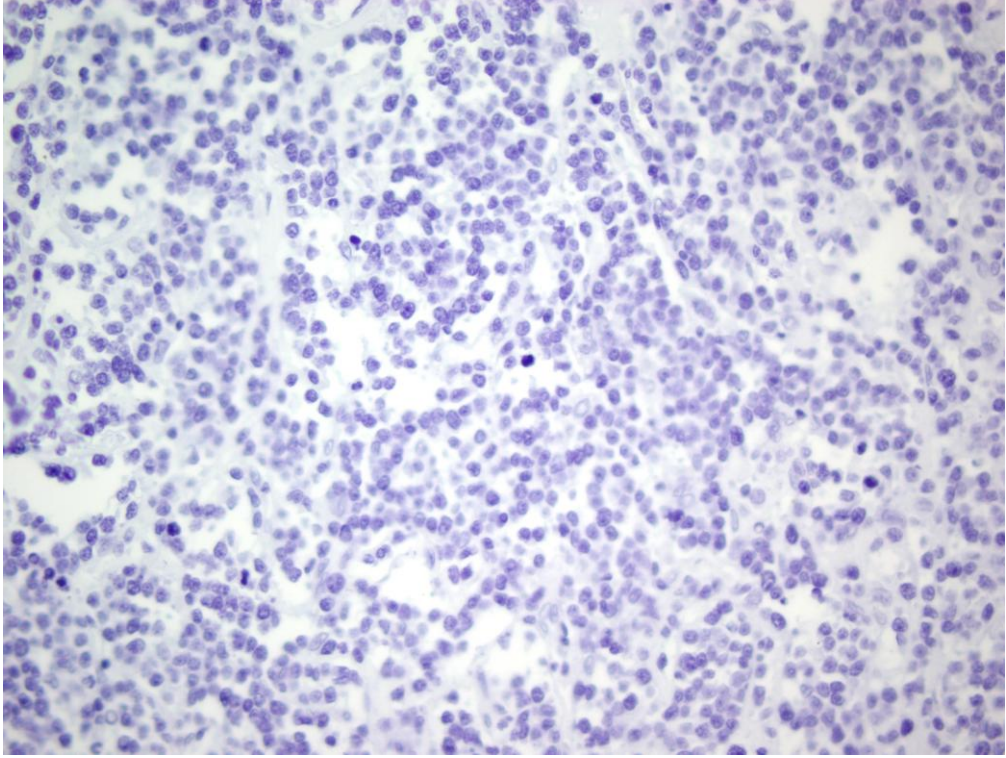


Resim 5B: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada düşük nükleer KI-67 immunreaktivitesi. (X400)

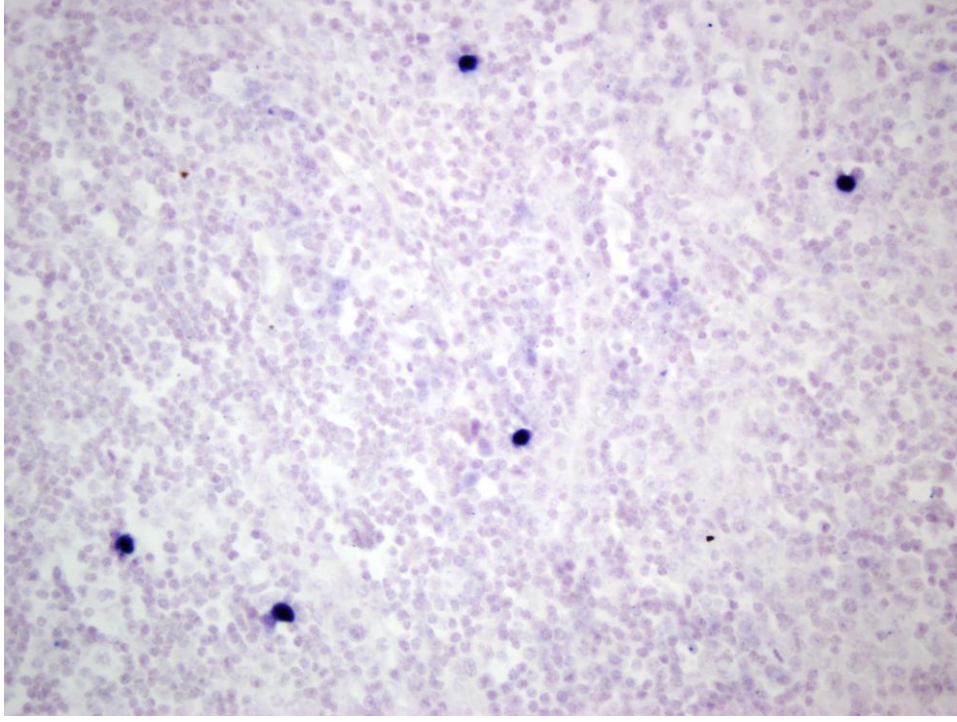
Olgularımızın 38'inde (%76) CD30 ile olumlu boyanma görülürken; 12 olguda (%24) CD 30 ile olumlu boyanma saptandı.

CISH yöntemi kullanılarak;

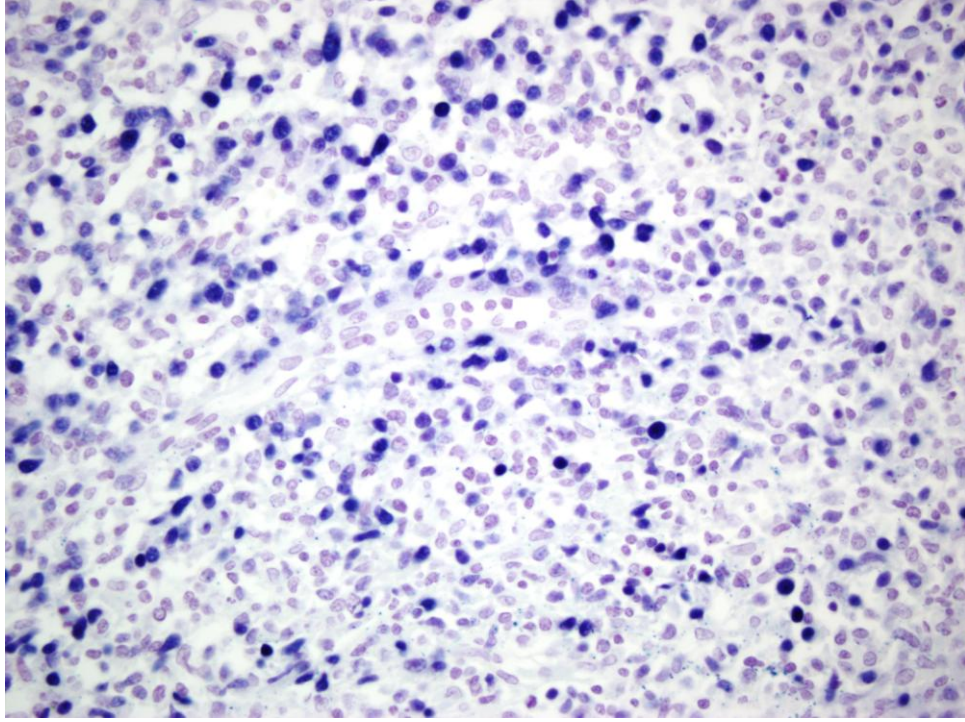
50 olgudan 13'ünde(%26) EBV RNA varlığı saptandı. 13 hastadan 9'unda EBER (EBV RNA) ile boyanma yoğunluğu 1(+), 2 'si 2(++), diğer 2 'si 3(+++) olarak kabul edildi.



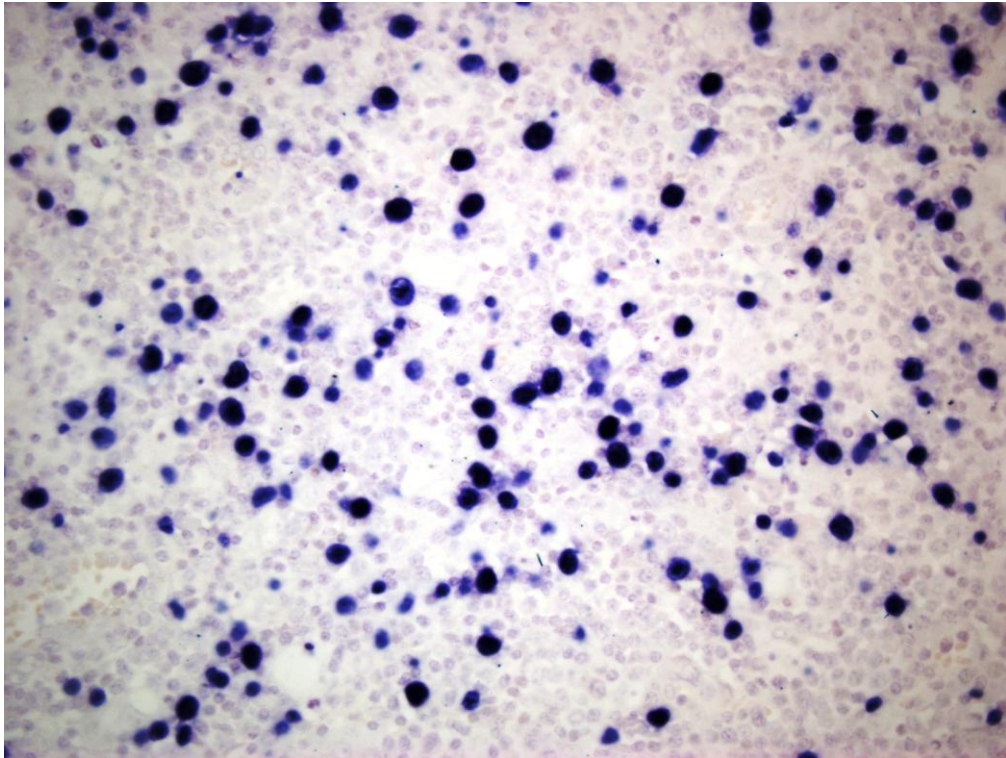
Resim 6: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada CISH yöntemi ile Eber pozitifliği 1(+) (X400)



Resim 7: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada CISH yöntemi ile Eber pozitifliği 2(++) (X400)



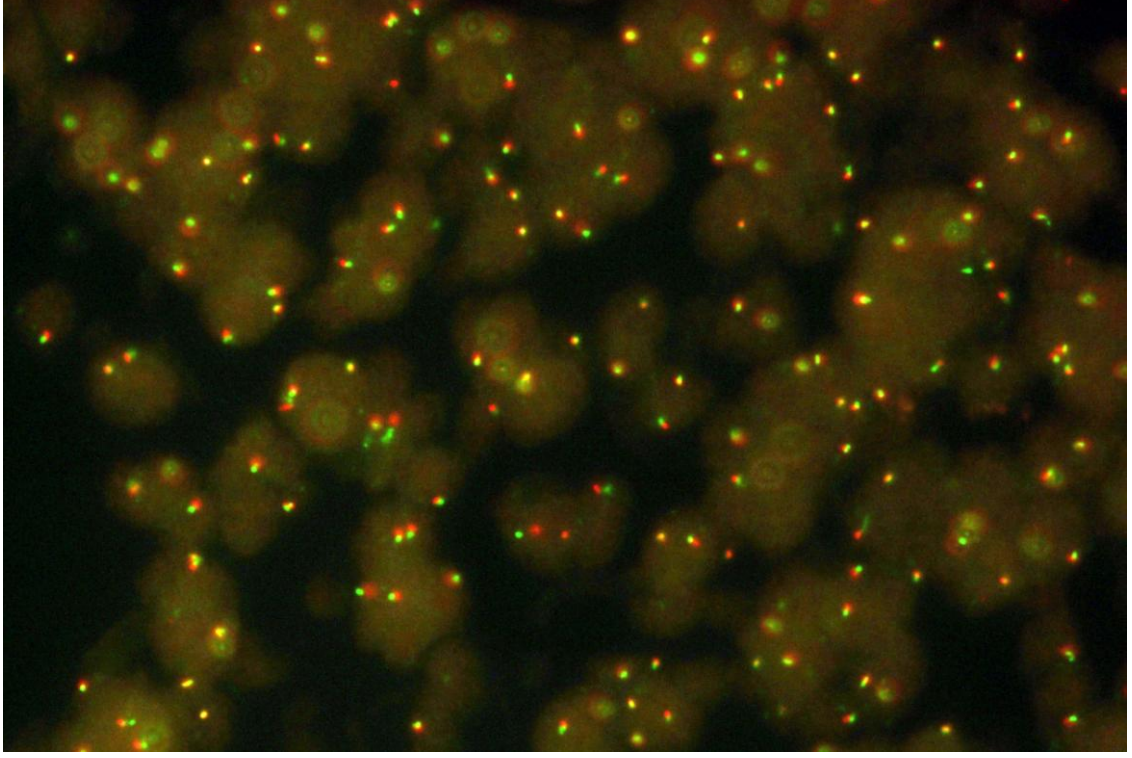
Resim 8A: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada CISH yöntemi ile Eber pozitifliği 3(+++) (X400)



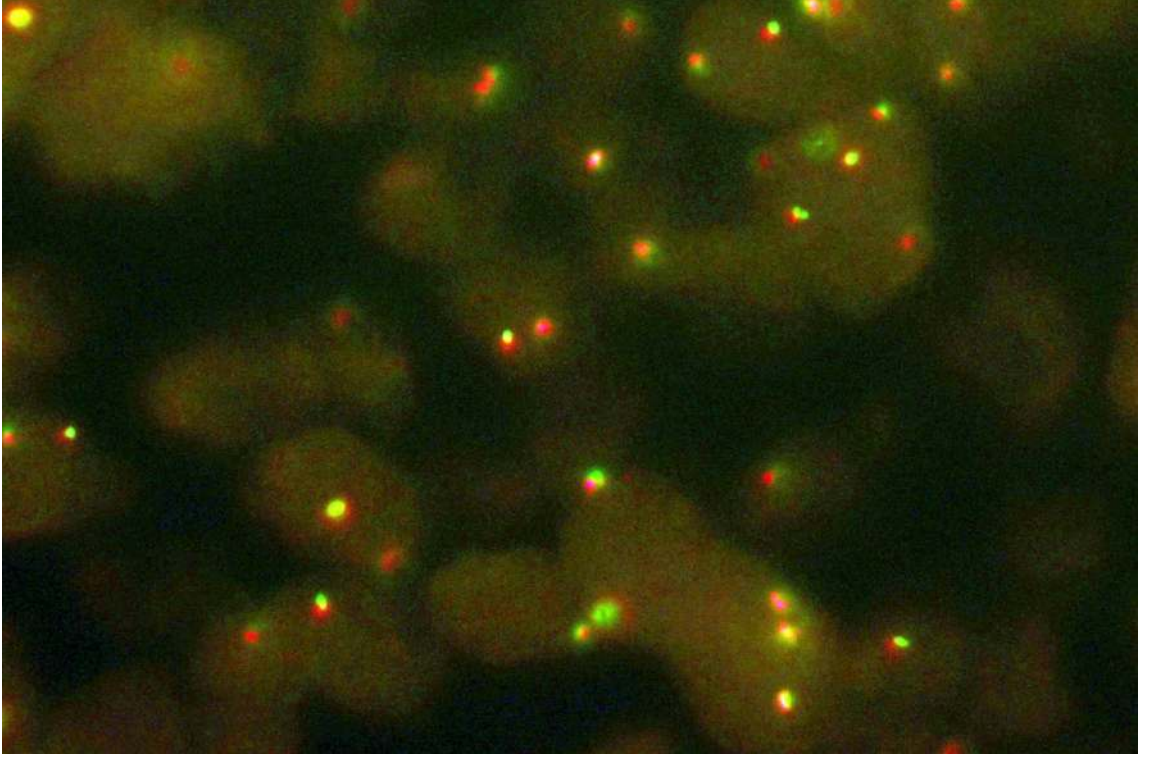
Resim 8B: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada CISH yöntemi ile Eber pozitifliği 3(+++) (X400)

FISH yöntemi kullanılarak;

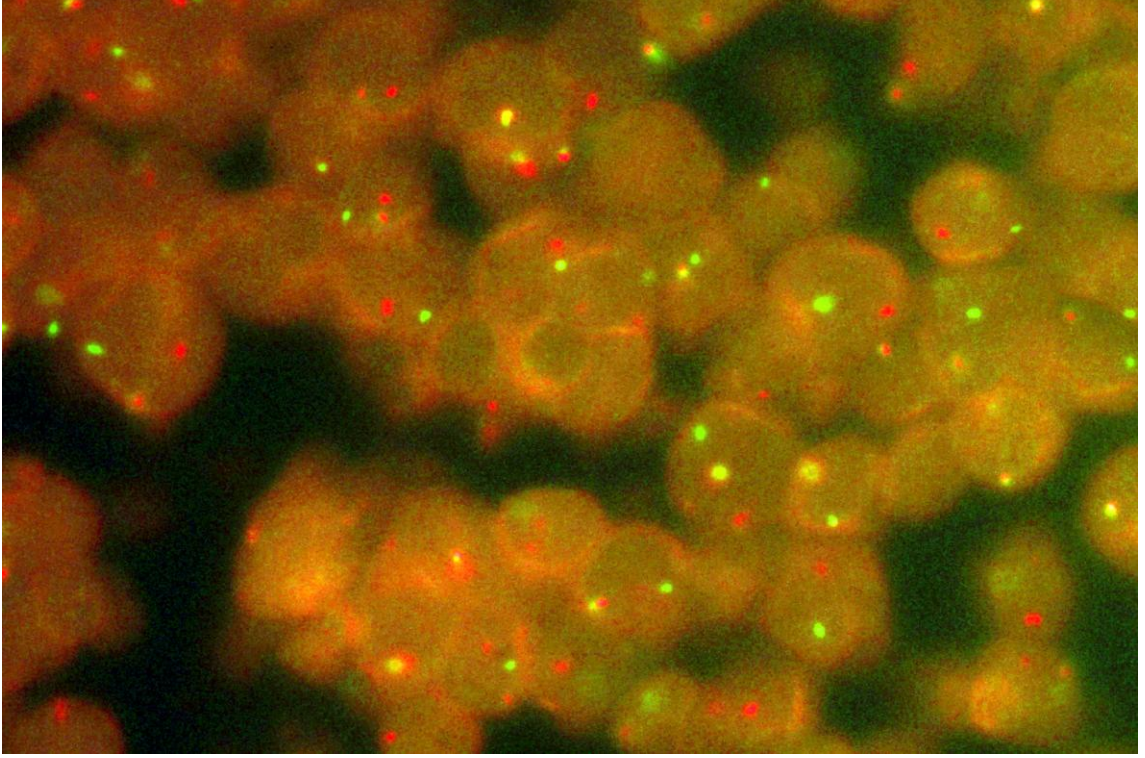
50 olgudan 6 'sında(%12) C-myc yeniden düzenlenmesi varlığı saptandı.



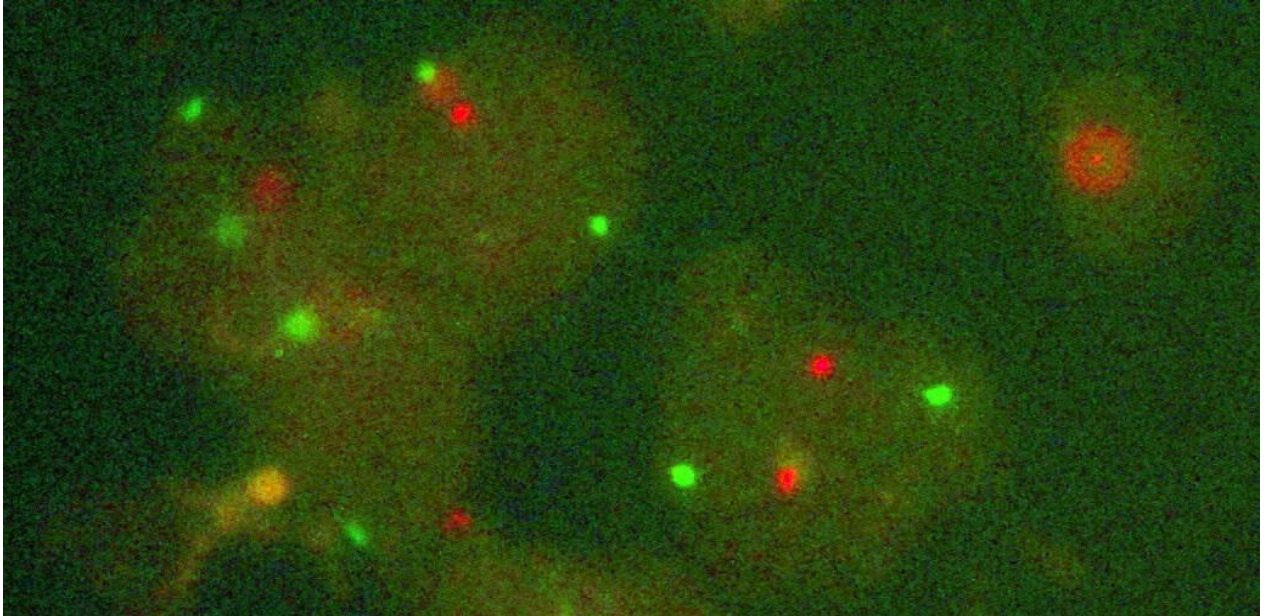
Resim 9A: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada FISH yöntemi ile c-myc yeniden düzenlenmesi saptanmayan olgu (normal gen düzenlenimi)



Resim 9B: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada FISH yöntemi ile c-myc yeniden düzenlenmesi saptanmayan olgu (normal gen düzenlenimi)



Resim 10A: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada FISH yöntemi ile saptanan c-myc yeniden düzenlenmesi



Resim 10B: Diffüz Büyük B hücreli lenfomada FISH yöntemi ile saptanan c-myc yeniden düzenlenmesi

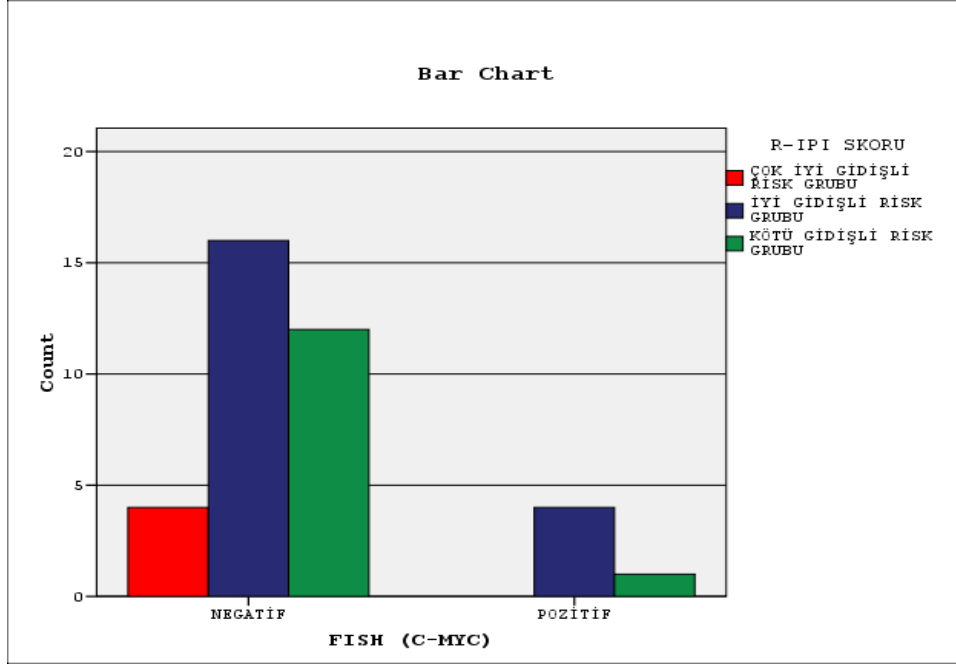
Evrelemede; modifiye Ann-Arbor sınıflaması kullanıldı. Olgular evrelerine göre sınıflandırıldıklarında 3 hasta (%6) evre I, 10 hasta (%20) evre II, 7 hasta (%14) evre III, 17 hasta (%34) evre IV olarak değerlendirildi. Bununla birlikte; 13 hastada (%26) ise takip kaybından dolayı evre belirlenemedi. Literatürde daha önce belirtilen veriler gözönünde bulundurularak; evre I ve II olarak değerlendirilen 13 olgu(%26); düşük evre; evre III ve IV olarak değerlendirilen 24 olgu (%48) ise yüksek evre olarak sınıflandırıldı.

Risk skoru belirlemede ise revize edilmiş uluslararası prognostik indeks (R- IPI) skoru kullanıldı. R-IPI skorlaması; yaş, serum LDH düzeyi, ECOG performans durumu, Ann Arbor evresi ve ektranodal tutulum varlığı kriterleri ve bu kriterlerin puanlanması ile belirlendi. Her kriter için belirlenen puanlama sonrasında; literatürdeki veriler göz önünde bulundurularak R-IPI skoru: 0 olan hastalar: “çok iyi gidişli”, 1 ve 2 olanlar: “iyi gidişli”, 3,4 ve 5 olanlar ise: “ kötü gidişli” risk grubu adı altında sınıflandırıldı.

Olgularımız R-IPI risk skorlamasına göre sınıflandırıldıklarında; 4 olgu (%8) “çok iyi gidişli”, 20 olgu (%40) “iyi gidişli”, 13 olgu (%26) “kötü gidişli” grup altında toplanırken 13 hastada (%26) takip kaybından dolayı R-IPI skoru belirlenemedi.

Bunun yanı sıra olgular; literatürdeki farklı kaynaklara dayanarak sınıflandırıldığında standart IPI skoru; 0-1 olan: düşük risk grubunda olanlarla, 2 olan: düşük-orta risk grubunda olanlar, bir grup altında sınıflandırılıp; “düşük risk grubu” olarak; 3 olan: orta-yüksek risk grubu ile 4-5 olan yüksek risk grubu birarada sınıflandırılarak; “yüksek risk grubu” sınıfı olarak değerlendirildi. Bu sınıflamaya göre olgularımızın 24’ü (%48) düşük risk grubu, 13’ü (%26) yüksek risk grubu olarak değerlendirildi. 13 hastada ise (%26) takip kaybından dolayı risk grubu belirlenemedi.

C-myc yeniden düzenlenmesine sahip 6 hastadan 1'i orta-yüksek risk grubu, 3'ü düşük-orta risk grubu, 1'i düşük risk grubu olarak R-IPI skorlamasına göre sınıflandırıldı. 1 hastada ise takip kaybından dolayı R-IPI skoru belirlenemedi (Grafik 2).



Grafik 2: C-myc yeniden düzenlenmesi varlığı- R-IPI ilişkisi

IPI skorlamasına göre ise bu hastalardan sadece 1'i kötü gidişli yüksek risk grubu, 4'ü ise iyi gidişli düşük risk grubu altında sınıflandırıldı.

Hastaların klinik özellikleri ve Bcl-2, Bcl-6, Ki-67, EBV RNA varlığı ve C-myc yeniden düzenlenmesine ait bilgileri tablo 5'te ayrıntılı olarak verilmiştir. Bununla birlikte bu klinik özelliklerin bahsedilen değerlerle karşılaştırılma bilgileri ise tablo 6 ve 7 de özetlenmiştir.

Tablo 5: Hastaların özellikleri ve BCL-2, BCL-6, Kİ-67, EBER VE C-MYC değerleri:

DBBHL (n=50)		n (%)
YAŞ	≤60	24 (%48)
	>60	26 (%52)
CİNSİYET	K	22 (%44)
	E	28 (%56)
EVRE	I-II	13 (%26)
	III-IV	24 (%48)
	TAKİP KAYBI	13 (%26)
B SEMPTOMU	YOK	17 (%34)
	VAR	21 (%42)
	TAKİP KAYBI	12 (%24)
K.İ TUTULUMU	YOK	40 (%80)
	VAR	10 (%20)
LDH	NORMAL	18 (%36)
	YUKSEK	32 (%64)
SAĞKALIM	EX	6 (%12)
	YAŞIYOR	26 (%52)
	TAKİP KAYBI	18 (%36)
R-IPI SKORU	DÜŞÜK RİSK	24 (%48)
	YÜKSEK RİSK	13 (%26)
	TAKİP KAYBI	13 (%26)
BCL-2	(-)	24 (%48)
	(+)	26 (%52)
BCL-6	(-)	23 (%46)
	(+)	27 (%54)
Kİ-67	<%50	17 (%34)
	≥%50	33 (%66)
EBER	(-)	37 (%74)
	(+)	13 (%26)
C-MYC	(-)	44 (%88)
	(+)	6 (%12)

Tablo 6: Hastaların özellikleri ile BCL-2 ve BCL-6 değerlerinin ilişkisi

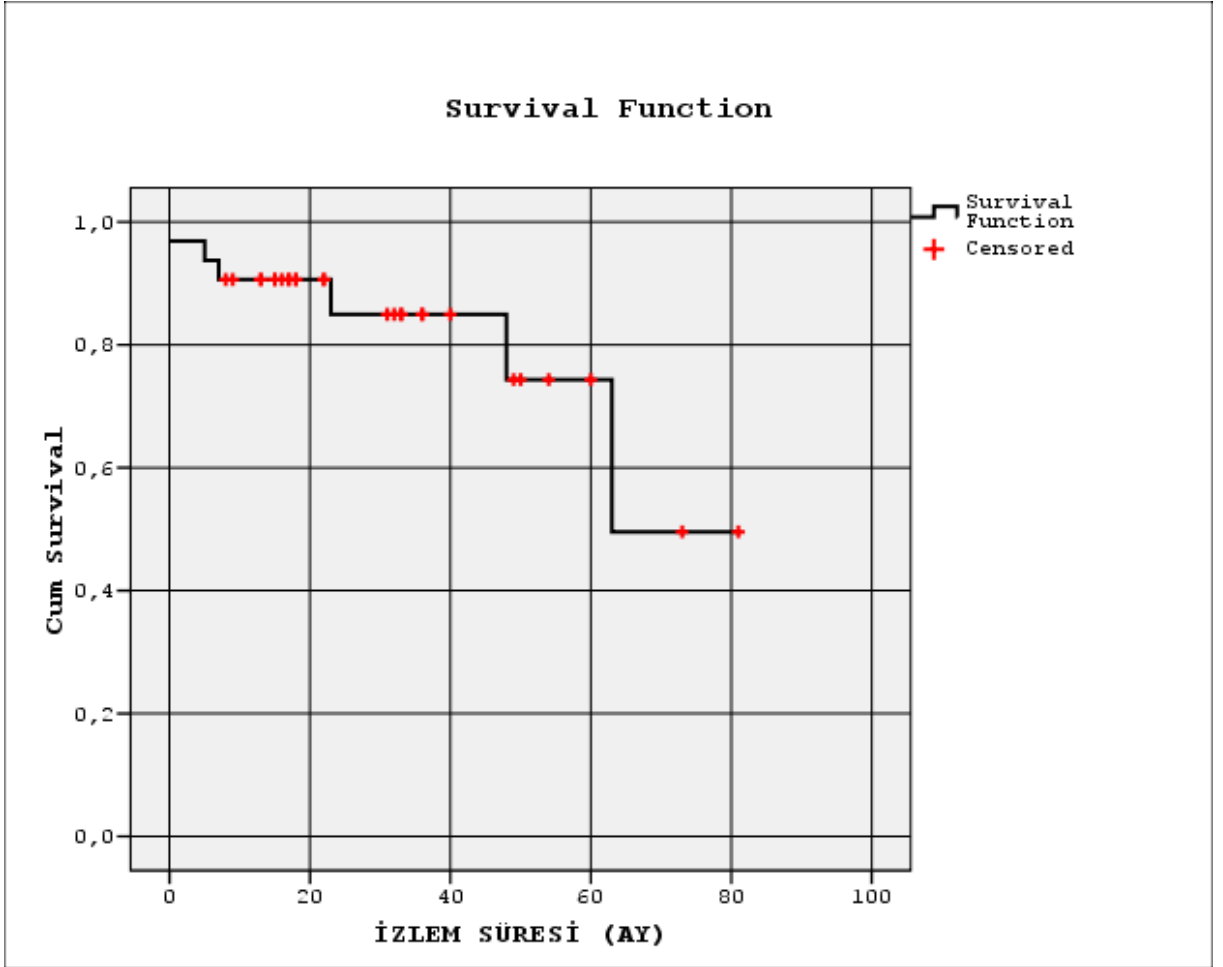
DBBHL (n=50)		BCL-2 (-)	BCL-2 (+)	p	BCL-6 (-)	BCL-6 (+)	P
YAŞ	≤60	14	10	0.262	11	13	1.000
	>60	10	16		12	14	
CİNSİYET	K	11	11	1.000	9	13	0.723
	E	13	15		14	14	
EVRE	I-II	7	6	1.000	5	8	0.570
	III-IV	12	12		13	11	
B SEMPTOMU	YOK	9	12	0.310	8	13	0.557
	VAR	11	6		9	8	
K.İ TUTULUMU	YOK	21	19	0.294	17	23	0.480
	VAR	3	7		6	4	
LDH	NORMAL	10	8	0.612	7	11	0.645
	YÜKSEK	14	18		16	16	
SAĞKALIM	EX	2	4	0.659	2	4	0.672
	YAŞIYOR	13	13		12	14	
R-IPİ SKORU	DÜŞÜK RİSK	12	12	1.000	10	14	0.418
	YÜKSEK RİSK	7	6		8	5	

Tablo 7: Hastaların özellikleri ile C-MYC, EBER RNA VE Kİ-67 değerlerinin ilişkisi

DBBHL (n=50)		C-MYC(-)	C-MYC(+)	P	EBER (-)	EBER (+)	p	Kİ-67<%50	Kİ-67=>%50	P
YAŞ	≤60	21	3	>0.005	16	8	0.416	10	14	>0.005
	>60		3		21	5		7	19	
CİNSİYET	K	20	2	>0.005	16	6	1000	9	13	>0.005
	E		4		21	7		8	20	
EVRE	I-II	12	1	>0.005	9	4	0.716	3	10	>0.005
	III-IV		4		18	6		8	16	
B SEMPTOMU	YOK	19	2	>0.005	15	6	1000	6	15	>0.005
	VAR		4		13	4		5	12	
K.İ TUTULUMU	YOK	37	3	>0.005	28	12	0.258	13	27	>0.005
	VAR		3		9	1		4	6	
LDH	NORMAL	17	1	>0.005	12	6	0.504	5	13	>0.005
	YÜKSEK		5		25	7		12	20	
SAĞKALIM	EX	5	1	>0.005	5	1	0.648	1	5	>0.005
	YAŞIYOR		4		18	8		8	18	
R-IPİ SKORU	DÜŞÜK RİSK	20	4	>0.005	17	7	1000	8	16	>0.005
	YÜKSEK RİSK		1		10	3		3	10	

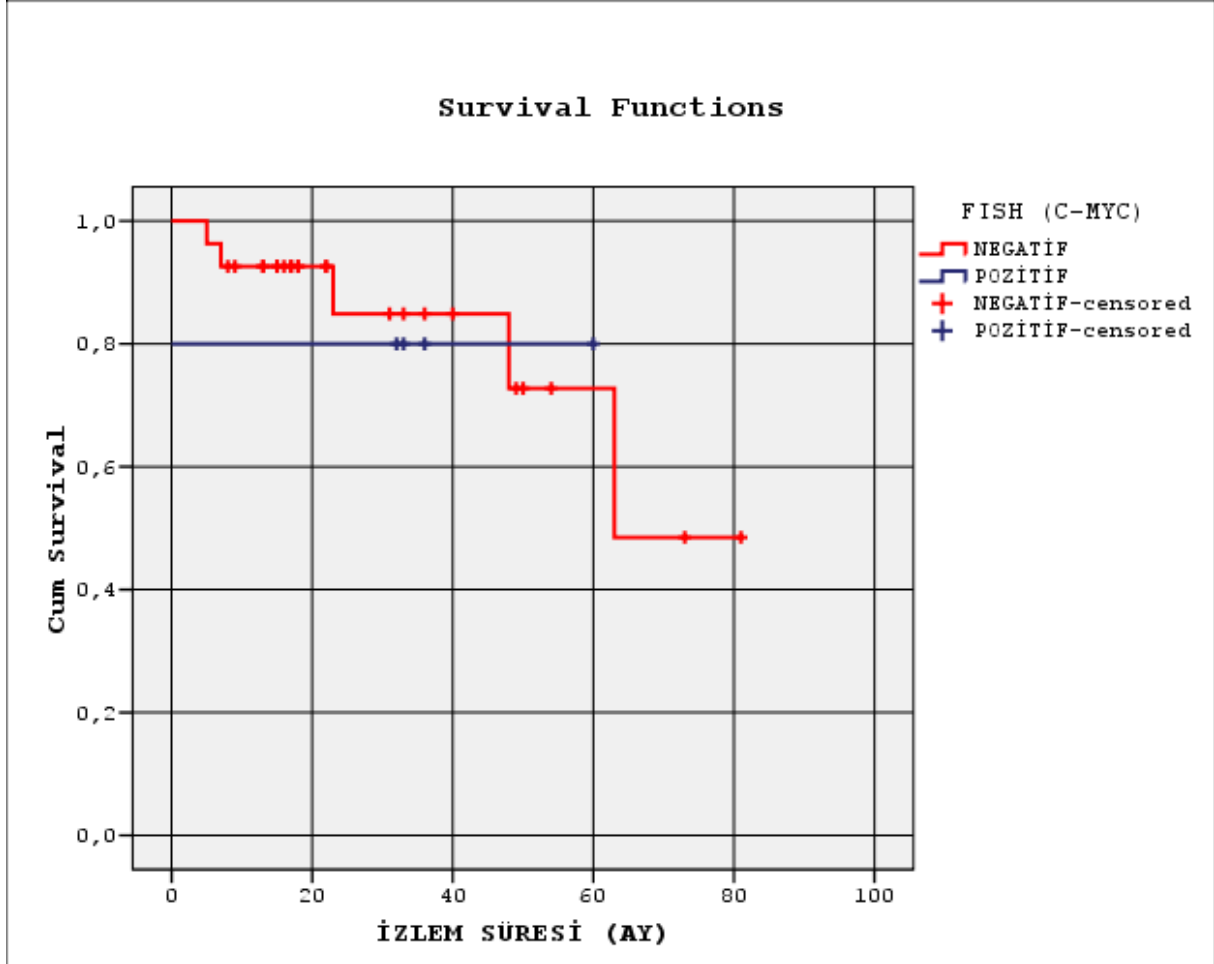
SAĞKALIM:

Çalışmamıza alınan 50 hastadan takip kaybı nedeniyle sadece 32'sinde sağkalım değerlendirilebilmiştir. Bu 32 hastadan 26'sı takipte yaşamını devam ettirmekteyken; 21' i takip sırasında komplet remisyonda, 5'i ise parsiyel remisyonadadır. 6 hasta ise takip sırasında hayatını kaybetmiştir. Çalışmamızda genel sağkalım oranı %81.3 olarak hesaplanmıştır (Grafik 3).



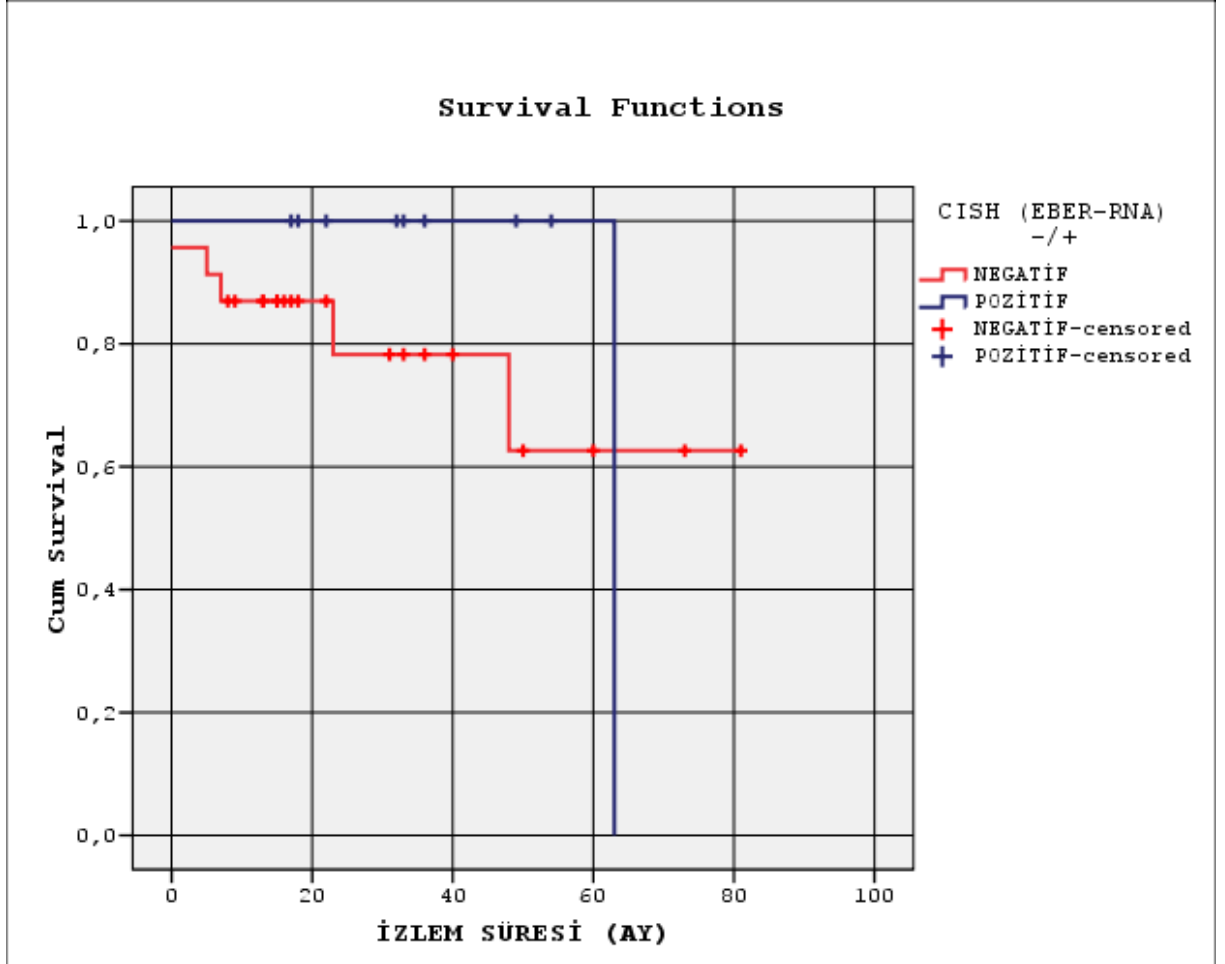
Grafik 3: Kaplan Meier eğrisi ile gösterilen genel sağkalım oranı

FISH Yöntemi ile C-myc yeniden düzenlenmesi saptanan hastalarda sağkalım %80, c-myc yeniden düzenlenmesi izlenmeyen hastalarda ise sağkalım %81.5'dir. Log Rank analizine göre bu fark anlamlı bulunmamıştır (Grafik 4) ($p=0.799$).



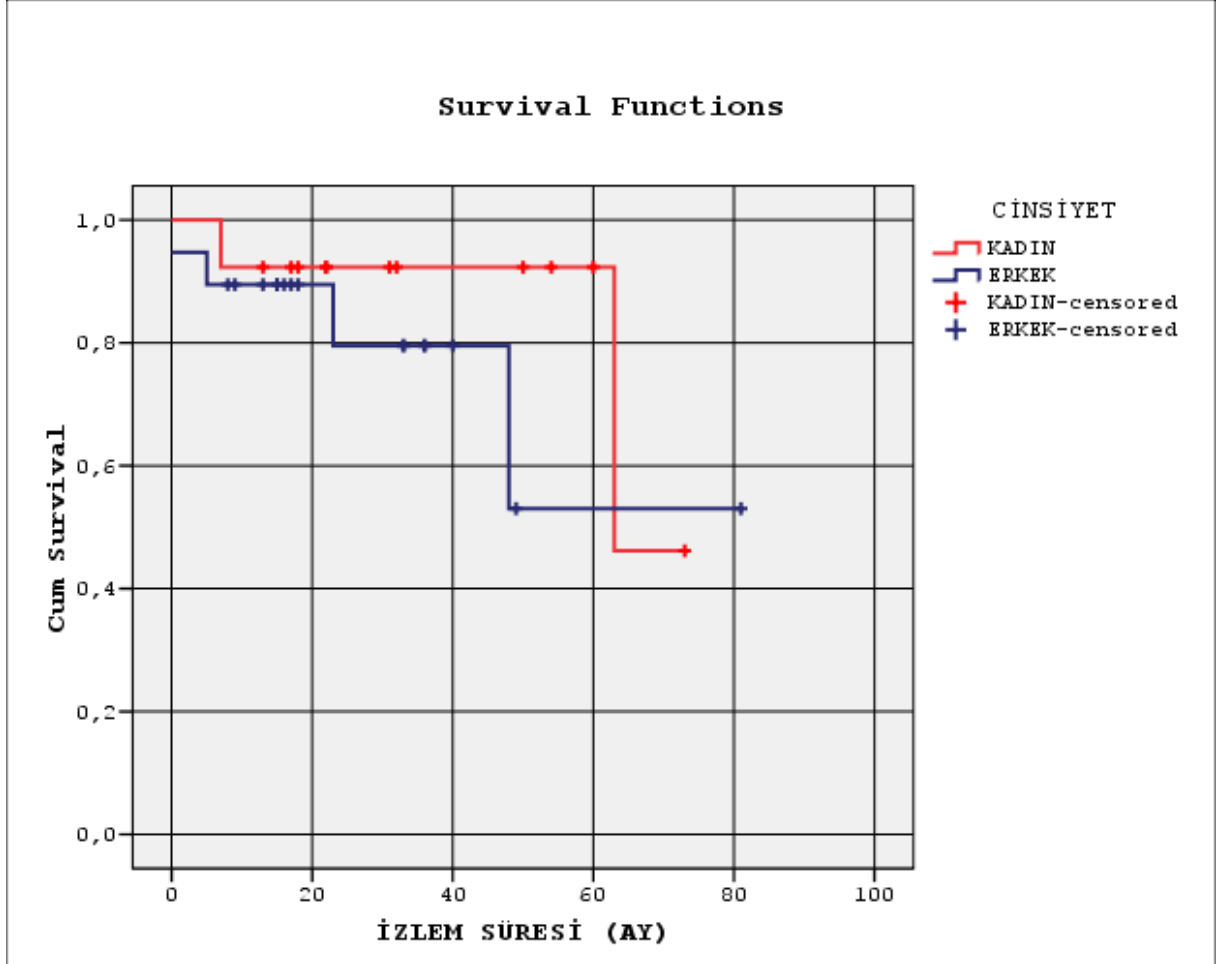
Grafik 4: c-myc pozitifliği ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier eğrisi

CISH yöntemi ile EBER RNA pozitifliği saptanan hastalarda sağkalım %88.9 iken EBER RNA negatif olan hasalarda sağkalım %78.3'tür. Log Rank analizine göre bu fark anlamlı bulunmamıştır (Grafik 5) ($p=0.404$).



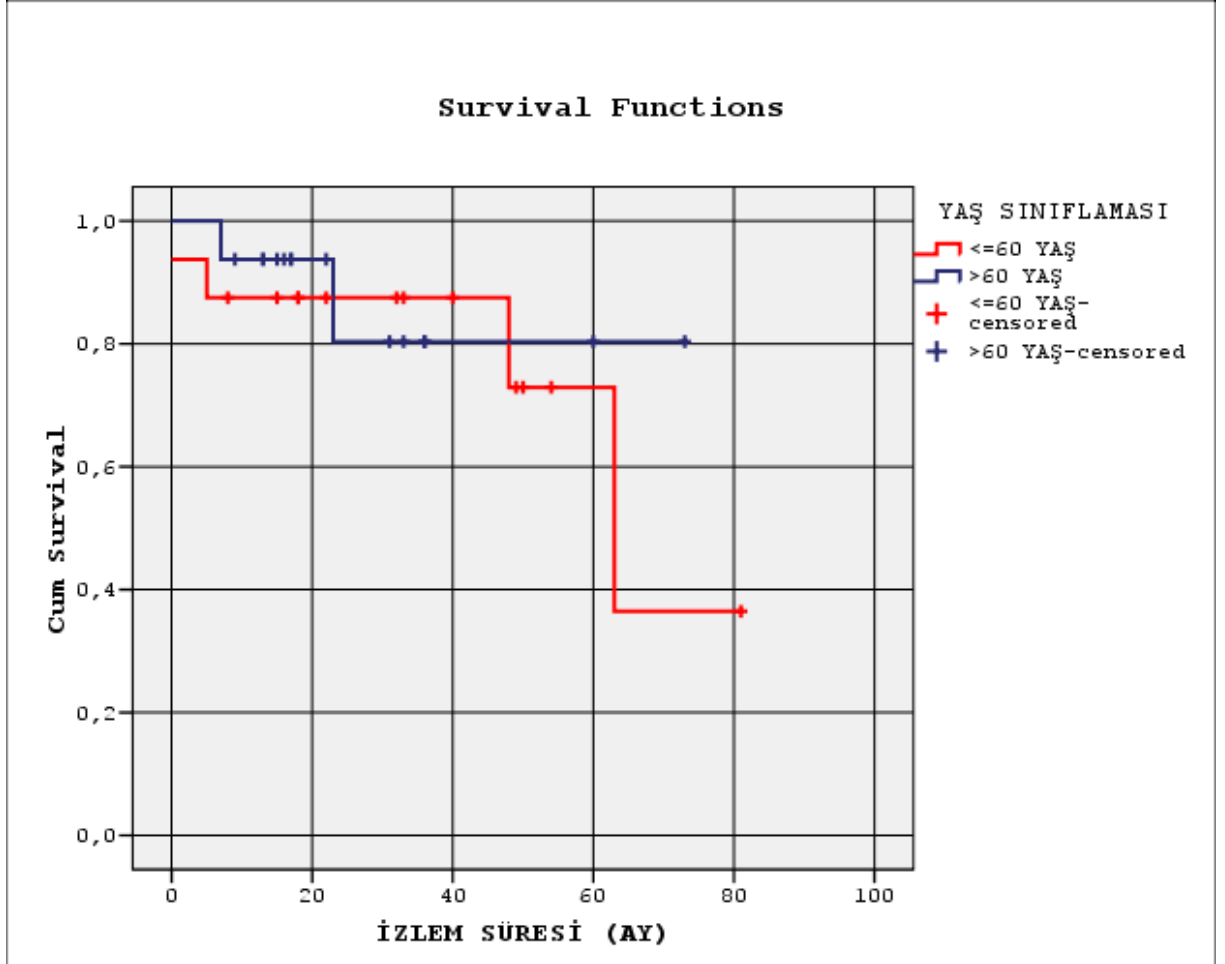
Grafik 5: EBER RNA pozitifliği ile sağkalım arası ilişkiyi gösteren Kaplan Meier eğrisi

Kadın hastalarda sağkalım %84.6 iken erkek hastalarda %78.9'dur. Log Rank analiz testine göre kadın hastalarla erkek hastalar arasında sağkalımda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Grafik 6) ($p=0.409$)



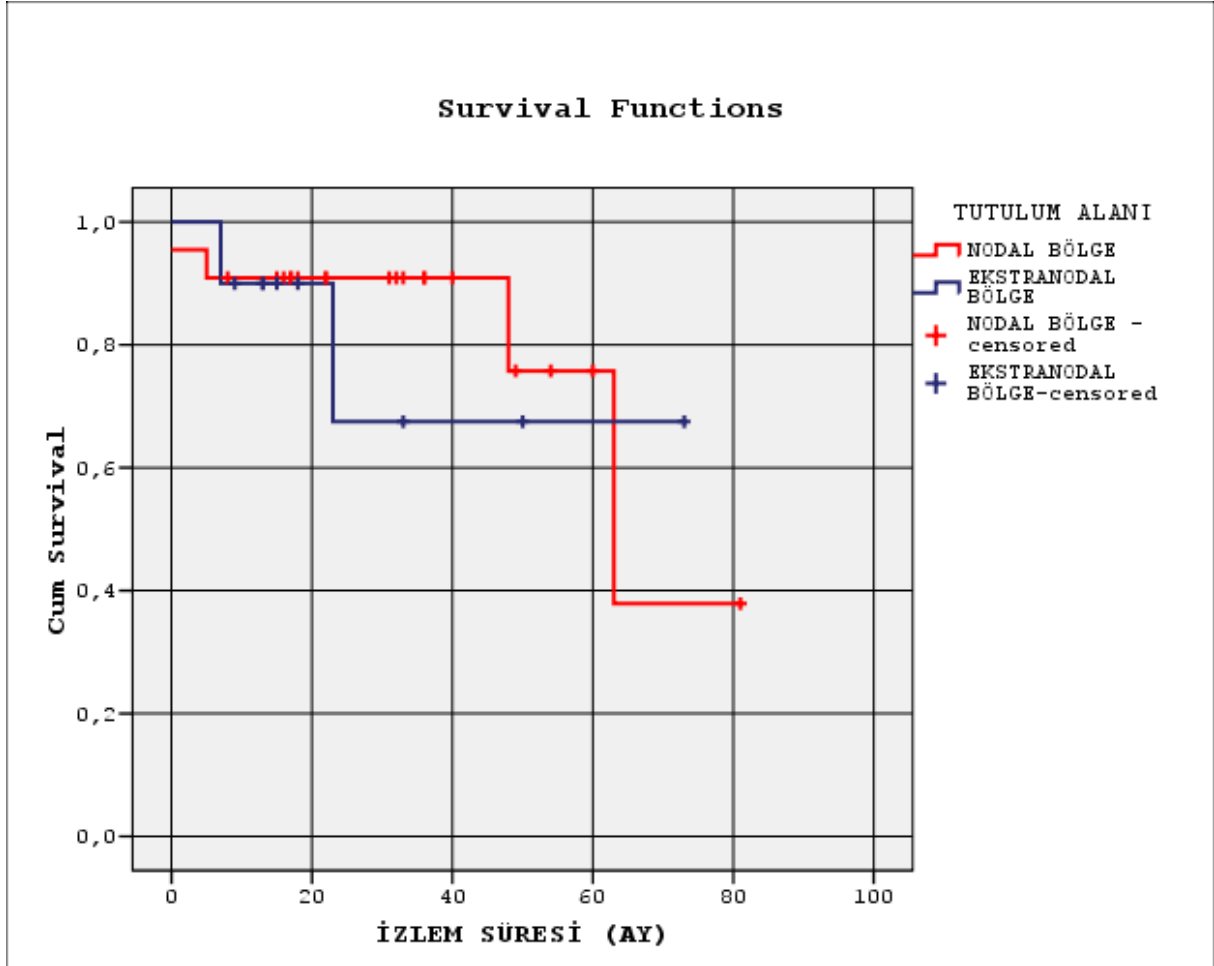
Grafik 6: Cinsiyet ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier eğrisi

60 yaş ve altındaki hastalarda sağkalım %75 iken 60 yaş üzerinde olan hastalarda sağkalım %87,5 olarak saptandı. Log Rank analiz testinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Grafik 7) ($p=0.630$).



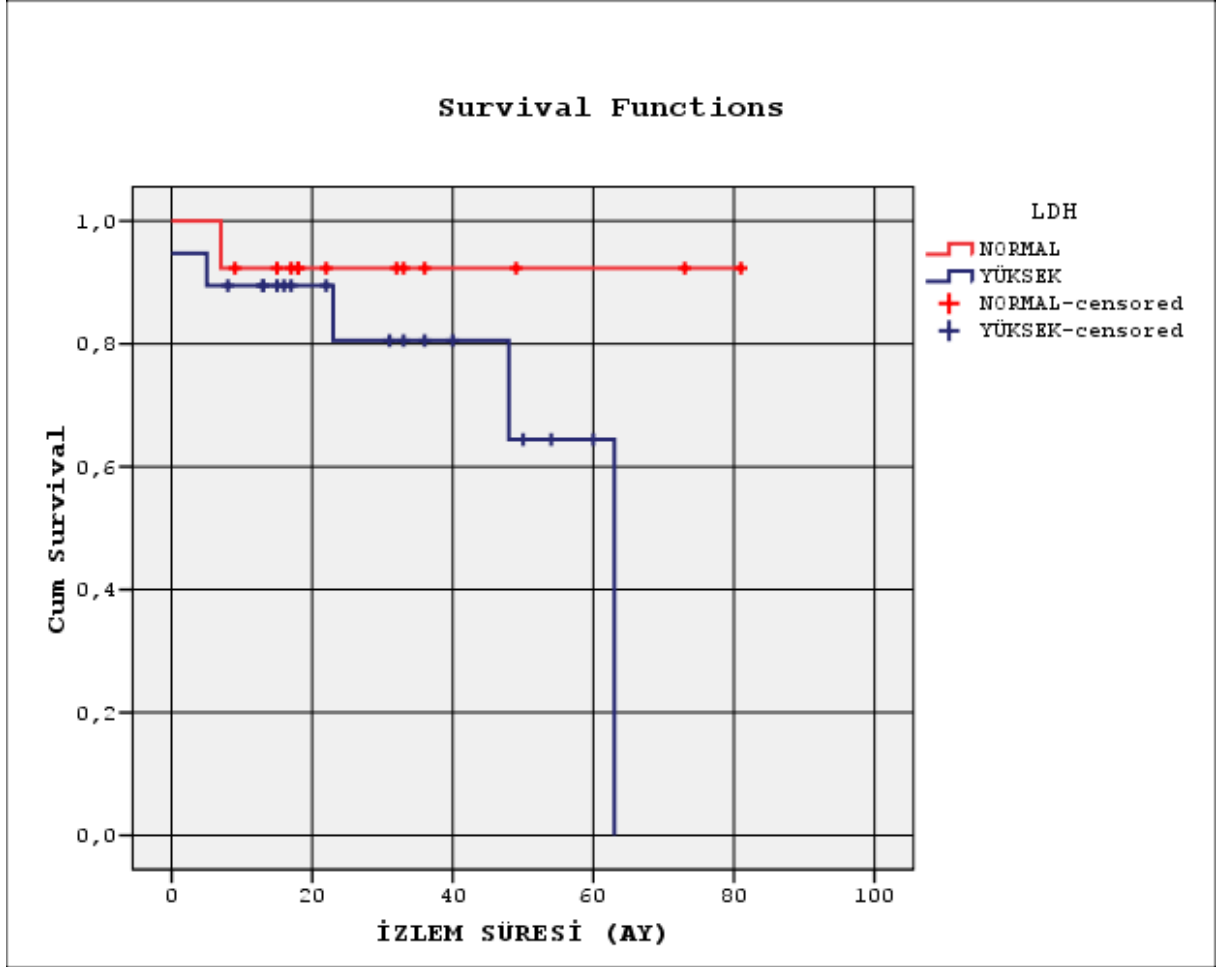
Grafik 7: 60 yaş grubu ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier eğrisi

Nodal tutulumu olan hastalarda sağkalım %81.8 iken ektranodal tutulumu olan hastalarda sağkalım %80 olarak saptanmıştır. Log Rank analiz testinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmamıştır (Grafik 8) ($p=0.859$).



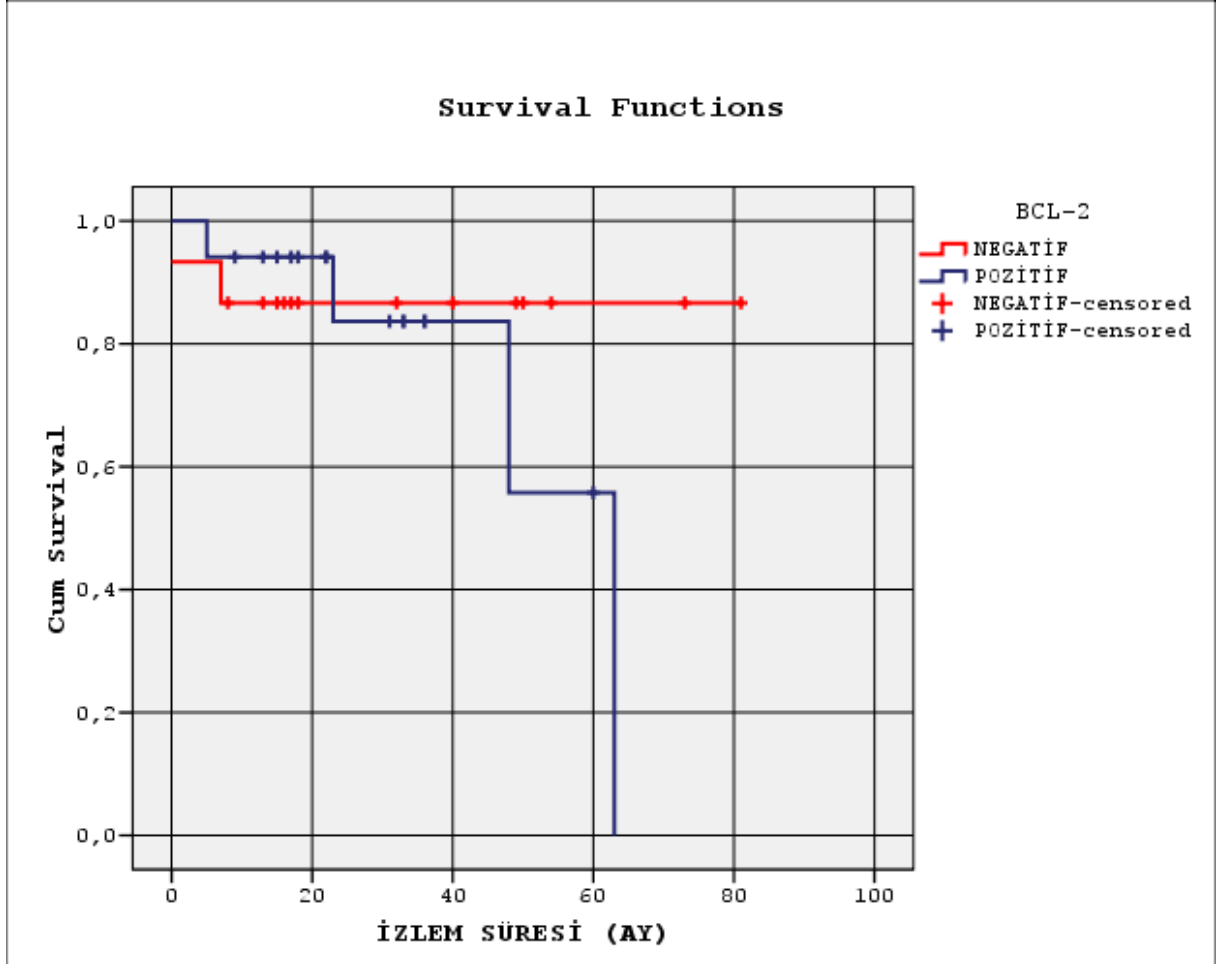
Grafik 8: Nodal ve ektranodal tutulumu olan hastalarda sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier eğrisi

Serum LDH değerleri normal olan hastalarda sağkalım %92.3 iken yüksek olan hastalarda sağkalım %73.7 olarak saptanmıştır. Bu iki grup arasında fark saptanmış olmasına rağmen Log Rank analizinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunamamıştır (Grafik 9) ($p=0.160$)



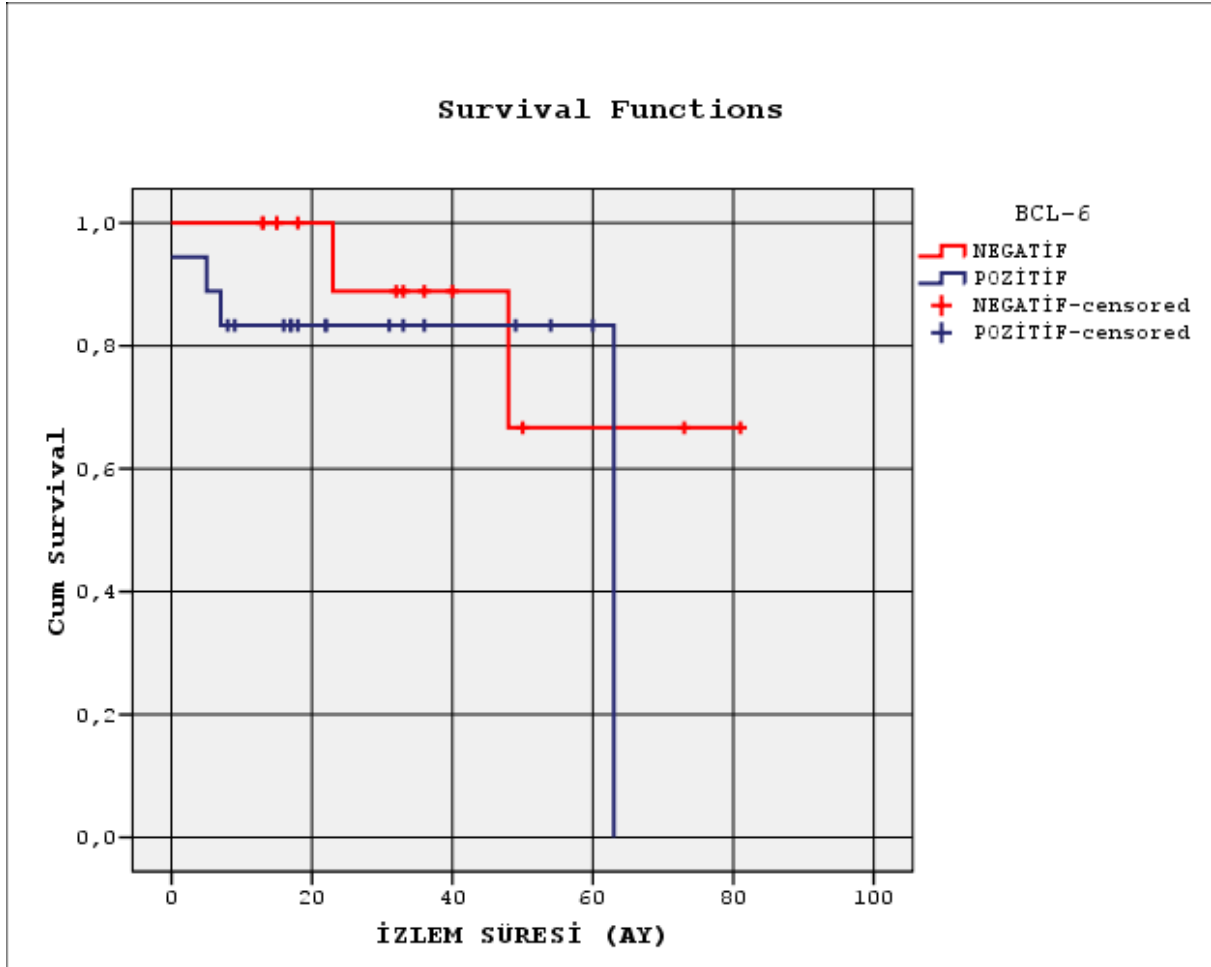
Grafik 9: Serum LDH değerleri ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier eğrisi

Bcl-2 pozitifliği saptanan hastalarda sağkalım %76.5 iken Bcl-2 negatif hastalarda sağkalım %86.7'dir. Bcl-2 pozitif olanlarda sağkalım oranında düşme izlendiği halde Log rank analiz testinde bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Grafik 10) ($p=0.354$)



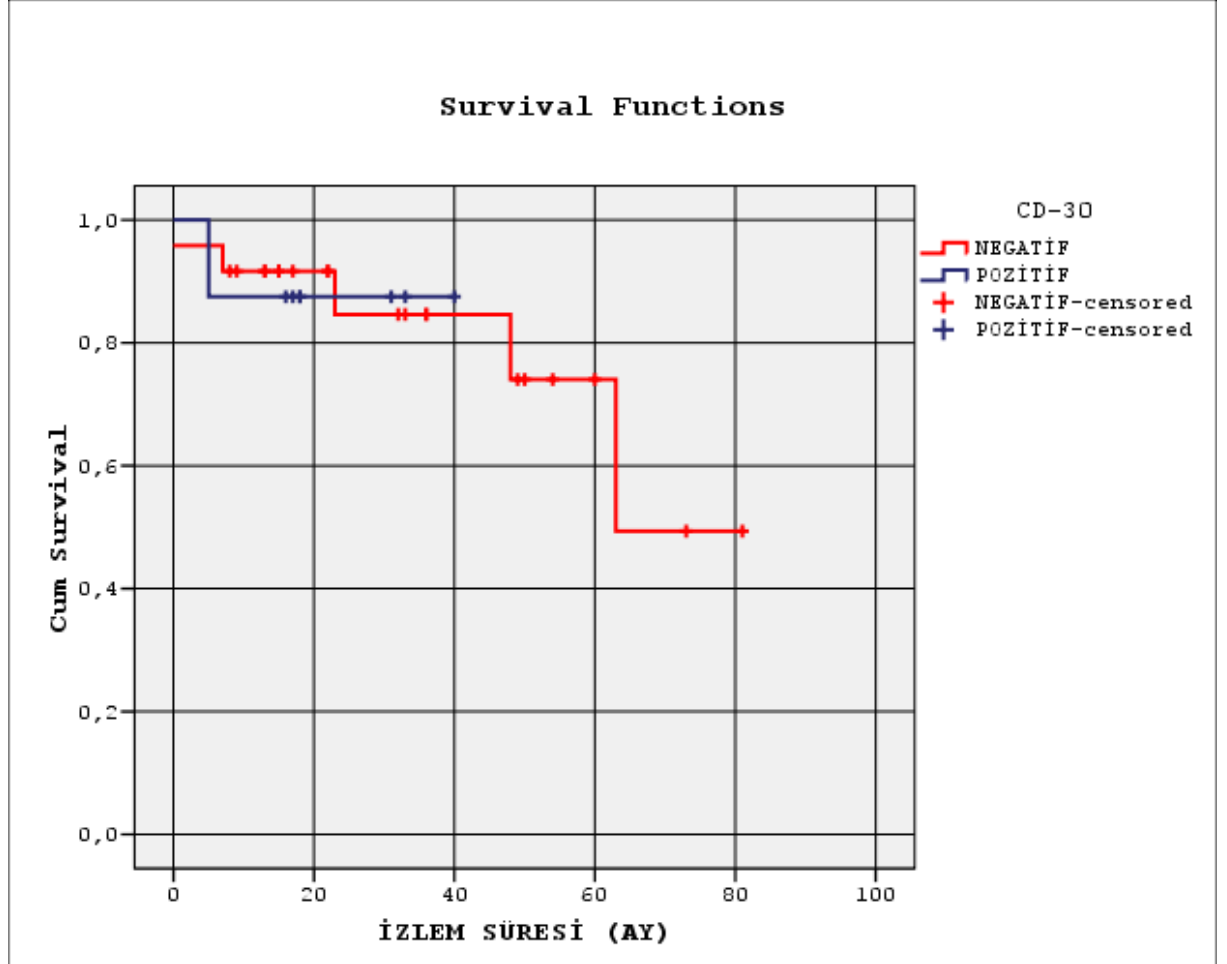
Grafik 10: Bcl-2 değeri ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier eğrisi

Bcl-6 pozitifliği saptanan hastalarda sağkalım %77.8 iken Bcl-6 negatif hastalarda sağkalım %85.7'dir. Log rank analiz testinde bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Grafik 11) ($p=0.369$)



Grafik 11: Bcl-6 değeri ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier eğrisi

CD30 pozitifliği saptanan hastalarda sağkalım %87.5 iken CD30 negatif hastalarda sağkalım %79.2'dir. Log rank analiz testinde bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Grafik 12) ($p=0.933$)



Grafik 12: CD30 değeri ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier eğrisi

TARTIŞMA

Lenfoid neoplazilerin sınıflandırılması hastalıkla ilgili bilinen tüm bilgilerin kullanımına dayanmaktadır. Çoğu lenfoid neoplazinin tanısında morfoloji ve immunfenotip yeterli olabilmektedir. Bununla birlikte hiçbir antijenik belirteç tek bir antiteye spesifik değildir. Bu nedenle; ancak morfolojik özelliklerin ve antijenik belirteçlerden oluşan bir panelin birlikte kullanımıyla tanıya ulaşılabilir. Çoğu B hücreli lenfoid neoplazide tanıya yardımcı karakteristik bir immunfenotipik profil mevcuttur. Bazı antijenik belirteçler spesifik hastalıklarda tanımlansa da; bu antijenler hiçbir zaman o hastalığa spesifik olmamaktadır. Bu durum tüm B hücreli lenfoid neoplazilerde geçerli olduğu gibi; DBBHL'larda da geçerlidir.

İmmunfenotipteki bu tanısal yetersizlik ve farklılıklar; B hücreli lenfoid neoplazilerin sınıflandırılmasında genetik özelliklerin rolünün artmasına neden olmaktadır. Günümüzde; PCR ile IGH tespiti, FISH yöntemi ile gen yeniden düzenlenmelerinin tespiti gibi genetik çalışmalar; B hücrelerinin klonalitesini tespit ve bazı hastalıklara spesifik translokasyonların tespitinde tanısal açıdan değerli yöntemler haline gelmektedir.

Lenfoid neoplaziler; zaman içerisinde ek genetik değişiklikleri kazanarak klonal evrimleşme geçirmektedirler. Bu nedenle lenfoid neoplazilerde zaman içerisinde hem morfolojik hem de immunfenotipik değişiklikler olmaktadır. Bu evrim sürecinde zaman içerisinde ortaya çıkan yeni genetik; daha agresif özellikler sergileyebilirken, daha ılımlı bir lenfoid neoplaziye dönüşümle de sonlanabilmektedir. Bununla birlikte bu genetiği aydınlatmak her iki durumda da önem kazanmaktadır.

DBBHL; klinik, morfolojik özellikleri, tedaviye yanıtları, sağkalım ve prognozları ile kendi içinde birbirinden farklılık gösteren heterojen yapıda bir lenfoma grubunu temsil etmektedir. Özellikle klinik takipte değerli olan IPI skorlamasında birbirine yakın değerlere sahip hastalar arasındaki sağkalım sürelerindeki farklılık; bu tümörlerde çeşitli moleküler ve genetik parametrelerin etkili olduğunu düşündürmektedir. Tüm bu parametrelerin değişkenliği gözönünde bulundurulduğunda uygun tedavi yöntemlerinin belirlenmesi için çeşitli genetik ve moleküler çalışmaların yapılma gerekliliği doğmuştur.

DBBHL; DSÖ 2008 sınıflamasında Klasik Hodgkin lenfoma (KHL) ve Burkitt lenfoma (BL) ile tamamen ayrı gruplar altında sınıflandırılrsa da bir grup olguda KHL' nın ve BL 'nın birçok özelliği DBBHL ile çakışabilmektedir. DSÖ 2008 sınıflamasında bu grupta kalan olgular; “DBBHL ve BL özellikleri arasında kalan başka türlü sınıflandırılmayan B-hücreli lenfoma” ve “DBBHL ve Klasik HL özellikleri arasında kalan başka türlü sınıflandırılmayan B-hücreli lenfomalar” olarak 2 ayrı gri zon lenfoma adı altında toplanmışlardır.

DBBHL ile BL için özellikle tedavi protokolleri birbirinden farklılık gösterdiği için ayırıcı tanıları mutlaka yapılmalıdır. BL; eğer müdahale edilmezse hızla ölümcül olabilmekteyken yoğun, etkili ve uygun tedavi protokolleri seçildiğinde tedavi edilebilir bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. BL; DBBHL'da sıklıkla kullanılan CHOP ve R-CHOP tedavilerine ise yanıtıdır. Morfolojik ve immunohistokimyasal olarak BL ve DBBHL arasında kalan daha önceleri Burkitt-benzeri lenfoma olarak tanımlanan grup DSÖ 2008 sınıflamasında “DBBHL ve BL özellikleri arasında kalan başka türlü sınıflandırılmayan B-hücreli lenfoma” adı altında toplanmışsa da bu grup hastalarda tedavi seçenekleri klinik verilerin ve takibin de henüz yetersiz olması sebebiyle henüz netliğini kazanmamıştır. Bu; tedaviyi ve bununla ilişkili olarak sağkalımı da etkileyen durum; DBBHL ve BL'nın mutlaka birbirinden ayrılması gerektiğini ve gri zon lenfoma grubu içerisinde sınıflamanın da tam bir çözüm sağlamadığını göstermektedir (67).

Birbiriyle ortak özellikler taşıyabilen, DBBHL ve BL arasında özellikler taşıyan morfolojiye sahip olgularda net bir sınıflama yapabilmek için CD10, BCL-6, BCL-2, KI-67 proliferasyon indeksi gibi çeşitli immunhistokimyasal yöntemlere, c-myc yeniden düzenlenmesinin tespiti ve EBV varlığının tespiti için ISH yöntemlerine başvurulmuştur (67). Ayrımında yetersiz kalındığında ise bir grup olgu “DBBHL ve BL özellikleri arasında kalan başka türlü sınıflandırılmayan B-hücreli lenfoma” grubu altında toplanmıştır.

Bu gri zon lenfoma adı altında sınıflandırılan, özellikleri tam olarak şu andaki DSÖ sınıflamasında bir gruba sokulamamış lenfoid neoplazilerin genetik özelliklerinin, varolan gen yeniden düzenlenmelerinin ve translokasyonlarının aydınlatılmaya ihtiyacı vardır. Bu nedenle bir sonraki DSÖ sınıflamasında daha net bir isim altında toplanabilmeleri için birçok çalışma yapılmış ve günümüzde de yapılmaya devam etmektedir.

Zhao ve arkadaşlarının (68) yaptığı bir çalışmada atipik morfolojiye sahip agresif matür B hücreli 8 olgu değerlendirilmiş olup bu 8 olguda ortak olarak CD10 ve/veya BCL-6

ekspresyonun yanısıra BCL-2 ekspresyonu saptanmıştır. Aynı zamanda bu hastalardan 6'sında c-myc yeniden düzenlenmesi varlığı ve ki-67 proliferasyon indeksleri ≤ 90 olarak tespit edilmiştir. Bu hastaların klinik takiplerinde Burkitt lenfoma için kullanılan tedavi yöntemlerinden fayda gördükleri saptanmış olup bu grup hastalar “Burkitt lenfoma ile Diffüz büyük B hücreli lenfoma arasında kalan gri zon lenfoma” olarak sınıflandırılmışlardır. Bu çalışmada agresif morfoloji ve c-myc yeniden düzenlenmesine sahip az sayıda hasta takip edilmiş olmasına rağmen; c-myc yeniden düzenlenmesinin %75 oranında saptanması ve literatürde birçok çalışmada atipik morfolojiye sahip, c-myc yeniden düzenlenmesine sahip DBBHL hastalarında Burkitt benzeri klinik gidiş saptanmış olması bu verilerin değerini desteklemiştir (22,68). Literatürde bu çalışma ve daha birçok çalışmada her zaman olmasa da, c-myc yeniden düzenlenmesi genellikle agresif klinik gidiş ile ilişkili bulunmuştur (4,5,63).

Khaldon Bodoor ve arkadaşlarının (69); 2012 yılında yayınlanan bir çalışmasında 46 DBBHL hastasında immunhistokimyasal olarak başta BCL-6 olmak üzere birçok belirteç çalışılmış ve prognostik ilişkileri değerlendirilmiştir. İmmunhistokimya dışında ise; yaş, cinsiyet, nodal tutulum değişkenleri de incelenmiştir. Bu çalışmada BCL-6 pozitifliği saptanan DBBHL hastalarında daha uzun süreli hastalıksız sağkalım tespit edilmiştir (22, 69). Bu veri; bu çalışma dışında başlıca Alizadeh ve ark, Lossos ve ark ve Wright ve arkadaşlarının da yaptıkları çalışmalarla desteklenmektedir (70-72). Bunun yanı sıra bu çalışmada erkeklerdeki prognoz daha iyi olduğu saptanmış olup erkek cinsiyetin prognostik önem taşıdığı ilk çalışma olmuştur (69).

Masir N ve arkadaşları (73); 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada; 124 B- hücreli lenfoma hastasında BCL-2 ve Ki-67 için double immunfloresan işaretleme yöntemi kullanarak BCL-2 protein ekspresyonu ile hücre proliferasyonu arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir. Foliküler lenfoma, marjinal zon lenfoma ve bir kısım KLL/SLL gibi düşük dereceli lenfomalarda neoplastik hücrelerin hücre siklusu içerisindeyken bcl-2 kaybına eğilimli olduğunu göstermişlerdir. Yani düşük dereceli lenfomalarda ki-67 proliferasyon indeksinin yüksek olduğu durumda BCL-2 ekspresyon kaybı beklenmektedir. Bu durum; foliküler lenfomada veya KLL/SLL hastalarında yüksek dereceli lenfomaya dönüşüm halinde bile korunmaktadır. Mantle zon lenfoma, DBBHL ve KLL/SLL 'nin bir kısım varyantı gibi yüksek dereceli lenfomalarda ise BCL-2 ve Ki-67 arasındaki bu ters ilişki izlenmemektedir. Bu hastalarda BCL-2 ve Ki-67 koekspresyon göstermekte olup Bcl-2 ekspresyonu ve yüksek ki-67 proliferasyon indeksi varlığı kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur.

Bununla birlikte bazı araştırmalarda Bcl-2 ekspresyonu iyi prognostik faktör olarak saptanmış olup (74); bazı yayınlarda ise sağkalımla ilişkili bulunmamıştır (30).

DBBHL'larda; "myc" yeniden düzenlenmesi ile eş zamanlı olarak BCL2 veya BCL6 pozitifliği gösteren ayrı bir B hücreli lenfoma grubu olarak ortaya çıkan Double Hit lenfomalar (DHL); agresif klinik gidişe ve kompleks karyotipe sahip, Burkitt lenfoma (BL), DBBHL ve B Lenfoblastik lösemi/lenfoma ile çakışan patolojik özellik spektrumuna sahip nadir neoplazilerdir. Diğer yüksek dereceli B hücreli neoplazilere kıyasla klinik ve patolojik spektrumları çok iyi tanımlanamamıştır. Buna rağmen yapılan çalışmalarda DHL'ların agresif klinik gidişe ve bugünkü uygulanabilir tedavilere rağmen kötü prognoza sahip olduğu görülmüştür (65,66). Sadece Rituksimab tedavisi alan hastalarla yapılan çalışmalarda mortalite oranı daha düşük saptanmıştır. Çakışan özelliklerine rağmen DHL 'lardaki bu klinik gidişin, gerek BL gerekse de DBBHL'dan farklı olduğu saptanmıştır.

Farklı morfolojik ve immunfenotipik spektrumlarından dolayı DHL'ların tanınması ve sınıflandırılması zorluk yaratmaktadır (65). Bu olgular günümüzde genelde "DBBHL ve BL özellikleri arasında kalan başka türlü sınıflandırılmayan B-hücreli lenfomalar" grubu altında sınıflandırılmışlardır (65,66).

DHL'lar tanı anında yüksek LDH düzeyi, B semptomları varlığı, kemik iliği tutulumu, ileri evre hastalık, ektranodal tutulum, tanı anında santral sistemi tutulumu gibi özelliklerle karakterize BL ve DBBHL'lara göre daha kötü prognozlu bir B hücreli lenfoma grubudur. (66). Çoğu hasta aylar içerisinde kemoterapiye rağmen kısa sürede hayatını kaybetmektedir. Komplet remisyon görülen nadir hasta grubunda ise kısa sürede relaps gelişmektedir. Bu hasta grubunda standart kemoterapiye ek olarak kullanılan rituksimabın faydası da DBBHL'nın aksine net değildir (75).

Yapılan alışmalarda DHL'ların Yüksek dereceli B hücreli lenfomaların sadece %3-5'ini oluşturan bir grup olmasına rağmen tanımlanan bu farklı özellikleri düşünöldüğünde ve morfolojik ve immunfenotipik heterojenitesi de göz önünde bulundurulduğunda; ayrı bir grup oluşturmakta olduğu farkedilmektedir ve ileride ayrı bir kategoride sınıflandırılmayı ve araştırılmayı hak etmektedir (66,75).

Matija Snuderl ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (66); gereksiz maliyet ve testi engellemek için tüm hasta gruplarında önerilmese de en azından yukarıda sayılan klinik ve

morfolojik özellikleri gösteren hastalarda FISH yöntemi ile Myc, BCL2 ve BCL6 değerlendirilmesi önerilmiştir (66).

Literatürde Barrans ve arkadaşları başta olmak üzere DBBHL hastaları arasında birçok geniş olgu serisinde yapılan araştırmalara göre; c-myc yeniden düzenlenme oranı; %3-16, DHL oranları %0-12, THL oranları ise %0 ile 3 arasındadır (64,75).

Biz ise 50 hasta ile yaptığımız çalışmamızda 6 hastada (%12) c-myc yeniden düzenlenmesi saptadık. Bu hastalardan 1'inde (%2) c-myc yeniden düzenlenmesi tek başına görülürken; 3 hastada (%6) “double hit” (2: myc+ BCL2+, 1: myc+ BCL6+), 2 hastada ise (%4) “triple-hit” (myc+ BCL2+ BCL6+) olarak saptadık. Literatürde tüm çalışmalarda her üçünün tespiti için FISH yöntemi kullanılmış olmakla birlikte; biz çalışmamızda sadece c-myc yeniden düzenlenmesini saptamak için FISH yöntemini kullanabildik. BCL2 ve BCL6 pozitifliğinin saptanması için ise sadece immunhistokimyasal yöntemleri kullanabildik. Buna rağmen oranlarımızı karşılaştırdığımızda, literatür ile uyumlu sonuçlar elde ettik (64,75).

Çalışmamızda c-myc yeniden düzenlenmesine sahip 6 hastadan 5'i (%83,3); Ki-67 proliferasyon indeksi $< \%50$ 'nin veya $\geq \%50$ olarak sınıflandırıldığında yüksek proliferasyon indeksine; 1'i (%16,7) ise düşük proliferasyon indeksine sahipti. Ki-67 proliferasyon indeksi %0-25, %26-49, %50-74 ve %75 üzeri olarak 4 grupta sınıflandırıldığında ise bu 5 hasta %75 üzeri grupta, 1 hasta ise %25-49 sınıfında gruplandırıldı. Bu sonuçlara göre c-myc yeniden düzenlenmesine sahip hastalarda %83,3 oranında yüksek proliferasyon aktivitesi saptanması dikkat çekiciydi. İstatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunamamış olsa da çalışmamızda bunun sebebinin c-myc yeniden düzenlemesine sahip hasta sayısının az olması olabileceğini düşündük.

DHL grubu; oldukça agresif seyirli bir lenfoma alt tipini temsil ettiğinden bu grup diğer lenfomalardan mutlaka ayrılmalıdır. Bununla birlikte bilinen morfolojiye sahip DBBHL'ların da DHL (özellikle BCL2+/MYC+) özelliğini taşıdığı durumda, günümüzde 2008 DSÖ sınıflamasında yer alan DBBHL ve BL özellikleri arasında kalan başka türlü sınıflandırılmayan B-hücreli lenfoma grubu altına alınmaktadır. Bu “gri zon” lenfoma grubu ise oldukça heterojen bir grubu temsil etmektedir ve geçici bir depo yeri olarak kullanılmaktadır. Bu gruptaki olguların biyolojik ve klinik davranışları ne tam olarak BL'ya ne de DBBHL'ya benzemektedir. Bunun yanı sıra bu gri zon aralığında kalan olgular da kendi aralarında büyük

farklılıklar içermektedir. Bu sebeple bir sonraki DSÖ sınıflamasında c-myc+ olgular ve özellikle DHL özelliğindeki olgular ayrı bir sınıflamayı hak etmektedirler.

Bizim çalışmamızda, c-myc yeniden düzenlenmesine sahip az sayıda hasta olsa da artık günümüzde IPI skorundan bağımsız olarak bu genetik parametreler değer kazanmaktadır. Bu parametreler literatürde bazı kaynaklarda da vurgulanmaktadır. Artık günümüzde klinik prognostik olan IPI skorundan bağımsız olarak; C-myc yeniden düzenlenmesine sahip DBBHL hastalarında kötü klinik gidiş beklenmektedir (47).

DBBHL'lar tedavisiz bırakıldığında ölümle sonuçlanan, 1-2 yıl sağkalıma sahip agresif bir hastalık olmakla birlikte multi-ajan kemoterapi ile potansiyel kür şansı olan lenfomalardır. Tedavide uzun yıllardır farklı kombine kemoterapi protokolleri uygulanmıştır. Son yıllarda ise kombine kemoterapi tedavisinde; Siklofosamid, Adriamisin (doksorubisin), Onkovin (vinkristin) ve Prednizondan oluşan "CHOP" protokolü veya varyantları standart olarak tercih edilmektedir. Bulky hastalıkta veya lokalize tümörde ise radyoterapi eklenmektedir. Bu kombine kemoterapi protokolleriyle komplet remisyon oranı 2/3 olmakla birlikte 1/3 hastada bu tedavi parsiyel remisyonla sonuçlanmaktadır.

Daha agresif tedavi rejimleri CHOP protokolüne üstünlük sağlamamakla beraber ilaç kullanımının standardize edilmesi veya etoposid, rituksimab gibi ek ajanların eklenmesi ile prognoz daha iyiye gitmektedir.

Bununla birlikte CHOP protokolüne üstünlük sağlayan tek ajan; son yıllarda daha da önem kazanmış, CD20 pozitif DBBHL hastalarında kullanılabilen, anti-CD20 monoklonal antikoru olan Rituksimab'tır. Rituksimab CHOP protokolüne ek olarak kullanılmaktadır ve "R-CHOP" protokolü olarak adlandırılmaktadır.

CD20 immunhistokimyası; B hücreli neoplaziler için tanısal olmasının yanısıra DBBHL 'da tedavinin yönlendirilmesinde ve etkili bir tedavi ajanı olan Rituksimabın eklenmesinde yol göstericidir (76).

Rituximab'ın özellikle daha yaşlı hastalarda ve BCL-2 pozitif DBBHL hastalarında sağkalımı %20'ye kadar artırdığı saptanmıştır. Bu tedavi günümüzde altın standart tedavi olarak kabul edilmektedir.

DBBHL’da Rituksimab kullanımının; sağkalımı artırdığına yönelik birçok çalışma ve yayın bulunmaktadır. Rituksimabın kullanımı günümüzde; Bcl-2 nin negatif etkisinden veya Bcl-6’ nin pozitif etkisinden daha değerli hale gelmiştir.

Rituksimabın; DBBHL’ lı hastalardan özellikle kötü prognostik faktör olarak sayılan non-GCB (germinal merkez dışı) alt tipine sahip olgularda sağkalımı belirgin bir şekilde artırdığını gösteren birçok çalışma varken; Li ZM ve arkadaşlarının (77), 2012 yılında yaptığı son bir çalışmaya göre; Ki-67 proliferasyon indeksi yüksek olan hastalarda R-CHOP tedavisinin sağkalıma etkisinin kısıtlı olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte R-CHOP tedavisine komplet remisyon ile yanıt veren hastaların ise daha çok düşük ki-67 proliferasyon indeksine sahip olduğu saptanmıştır. Bu durum sağkalımı belirlemede, yüksek proliferasyon indeksinin önemli bir belirteç olduğunu göstermektedir (77).

Sarah Park ve ark (21) yaptığı literatürdeki en geniş serilerden biri olan; 380 hastalık bir çalışmada DBBHL hastalarında EBV pozitifliğinin tedaviye yanıt ve sağkalım üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Bu çalışmada EBER pozitif hasta sayısı %9 olarak belirtilmiştir. Bununla birlikte literatürde geniş olgu serilerine ait çalışmalarda DBBHL hastaları arasında EBER pozitifliğinin %8-11 arasında değiştiği görülmektedir (78).

EBER pozitifliği görülen hasta grubu; genelde 60 yaş üzerinde, Ann-Arbor evre III/IV, ektranodal tutulum alanı 1’den fazla, IPI skoru yüksek olan hastalardan oluşmaktadır. Bununla birlikte bu hastalarda B semptom varlığı daha sık olarak saptanmış, ilk tedaviye yanıtları daha düşük olarak değerlendirilmiştir. EBER (+) ve EBER(-) hasta grupları arasında tedavi seçiminde değişkenlik olmamasına rağmen EBER(+) hastalarda kemoterapi yanıtı daha düşük olarak değerlendirilmiş olup düşük sağkalım oranı ile ilişkili bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda ise CISH yöntemi ile 50 DBBHL hastasından 13’ünde (%26) EBER RNA varlığı saptandı. Bu değer literatürde farklı yayınlarda birbirinden farklılık gösteren ortalama olarak da %8-11 olarak belirtilen değerlerin üstündedir. Bununla birlikte EBER RNA varlığı saptanan hastalardaki sağkalım literatürdekinin aksine istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da EBER RNA negatif olgulara göre daha yüksek bulunmuştur.

SONUÇLAR

Çalışmamızda c-myc yeniden düzenlenmesinin ve EBER RNA varlığının sağkalımla ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bunun sebebi çalışmamıza alınan 50 hastadan takip kaybı nedeniyle son durumu bilinmeyen 18 hastanın sağkalımının değerlendirilememiş olması olabilir.

Literatürde c-myc yeniden düzenlenmesine sahip olgularının ve özellikle de double hit lenfoma olgularının kötü prognostik gidiş gösterdiği vurgulanmaktadır. Bizim çalışmamızda c-myc yeniden düzenlenmesine sahip olgularda istatistiksel olarak kötü prognoz ile ilişki bulunamamıştır. Bunun sebebi çalışmamızda az sayıda (6/50 hasta) c-myc yeniden düzenlenmesine sahip hasta olması olabilir.

Bununla birlikte daha geniş serili, daha düzenli ve uzun süreli takibe sahip çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Jaffe ES, Haris NL, Stein H, Wardiman JW. WHO Classification of Tumours. Pathology & Genetics: Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2008.
2. Sjö LD, Poulsen CB, Hansen M, Moller MB, Ralfkiaer E. Profiling of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry: identification of prognostic subgroups. *Eur J Haematol* 2007; 79: 501-507.
3. Iqbal J, Joshi S, Patel KN, Javed SI, Kucuk C, Aabida A. Clinical implication of genome-wide profiling in diffuse large B-cell lymphoma and other subtypes of B-cell lymphoma. *Ind J Cancer* 2007; 44:72-86.
4. Vitolo U, Gaidano G, Botto B, et al. Rearrangements of bcl-6, bcl-2, c-myc and 6q deletion in B-diffuse large-cell lymphoma: Clinical relevance in 71 patients. *Ann Oncol.* 1998; 9:55–61.
5. Wu G, Keating A. Biomarkers of potential prognostic significance in Diffuse Large B-cell lymphoma. *Cancer* 2006; 106:247-57.
6. Chang C, Mcclintock S, Cleveland R, Trzpuć T, et al. Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in Diffuse large B cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2004; 28:464-470.
7. Hunt KE, Reichard KK. Diffuse large B-cell lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 118-24.
8. Garvin AJ, Simon R, Young RC, Devita VT, Berard CW. The Rappaport classification of Non Hodgkin lymphomas: a closer look using other proposed classifications. *Semin Oncol* 1980; 7(3)234-43.
9. Gurbaxani S, Anastasi J, Hyjek E. Diffuse large B-cell lymphoma—more than a diffuse collection of large B cells: An entity in search of a meaningful classification. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:1121–1134.
10. Poulsen CB, Borup R, Nielsen FC, Borregaard N, et al. Microarray- based classification of Diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2005; 74: 453- 465.
11. Paepe P, Peeters W. Diffuse large B-cell lymphoma: a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas comprising several distinct entities. *Leukemia* 2007; 21:37-43.
12. Sukpanichnant S, Pongpruttipan T. Commentary on the WHO classification (2008) of malignant lymphoma. *Siriraj Med J* 2009; 61: 154-159.

13. Chan ACL, Chan JKC. Diffuse large B cell lymphoma, In Jaffe ES, Harris NL, Wardiman JW, Campo E. Hematopathology 1st ed. Elsevier, Saunders 2011; 349-382
14. Hartge P, Devesa SS, Fraumeni JF Jr. Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Surv.*1994;19-20:423-53.
15. De Roos AJ, Davis S, Colt JS, Blair A, Airola M, Severson RK, et al. Residential proximity to industrial facilities and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Environ Res.* Jan 2010;110(1):70-8.
16. Cohen M, Matteo E. Epstein–Barr virus presence in pediatric diffuse large B-cell lymphoma reveals a particular association and latency patterns: Analysis of viral role in tumor microenvironment. *Int. J. Cancer* 2012; 000: 000–000.
17. Castillo J, Beltran B, Miranda R, et al. Epstein-Barr virüs positive Diffuse Large B-cell lymphoma of the elderly: what we know so far *The oncologist* 2011;16:87-96.
18. Adam P, Bonzheim I, Fend F, et al. Epstein-Barr Virus-positive Diffuse large B-cell lymphomas of the elderly. *Adv Anat Pathol.* 2011;18:349–355.
19. Asano N, Yamamoto K, Tamaru J, et al. Age-related Epstein-Barr virus (EBV)-associated B-cell lymphoproliferative disorders: comparison with EBV-positive classic Hodgkin lymphoma in elderly patients. *Blood.* 2009;113:2629–2636.
20. Oyama T, Ichimura K, Suzuki R, et al. Senile EBV+ B-cell lymphoproliferative disorders: a clinicopathologic study of 22 patients. *Am J Surg Pathol.* 2003;27:16–26.
21. Park S, Lee J, Ko YH, et al. The impact of Epstein-Barr virüs status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2007; 110:972-978.
22. Colomo L,Guillermo A,Perals M, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003; 101:78-84.
23. Zinzani P, Dirnhofer S, Sabattini E, et al. Identification of outcome predictors in diffuse large B-cell lymphoma: Immunohistochemical profiling of homogeneously treated de novo tumors with nodal presentation on tissue micro-arrays. *Haematologica* 2005; 90:341-347.
24. Hans C, Weisenburger D, Greiner T, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103:275-282.

25. Nagela S, Hirschmanna P, Dirnhofera S. Coexpression of CD44 variant isoforms and receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM, CD168) is an International Prognostic Index and C-MYC gene status independent predictor of poor outcome in diffuse large B-cell lymphomas. *Experimental Hematology* 2010;38:38–45.
26. Sehn L, Berry B, Chhanabhai. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors Project. *N Engl J Med* 1993; 329: 987-994
27. Uzurov-Dinić V , Savić A , Lazarević T , Cemerikić-Martinović V , Agić D , Popović S . Prognostic factors in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Med Pregl* 62(3-4): 171-176; 2009.
28. Shipp MA. Prognostic factors in aggressive nonHodgkin's lymphoma: who has "high-risk" disease? *Blood* 83(5): 1165-1173; 1994.
29. Offit K, Lo Coco F, Louie DC, et al: Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1994; 331:74-80.
30. Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, et al: Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998; 92:3152-3162.
31. Akasaka T, Akasaka H, Ueda C, et al: Molecular and clinical features of non-Burkitt's, diffuse large-cell lymphoma of B-cell type associated with the c-MYC/immunoglobulin heavy-chain fusion gene. *J Clin Oncol* 2000; 18:510-518.
32. Hummel M, Bentink S, Berger H, et al: A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med* 2006; 354:2419-2430.
33. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346:1937-1947.
34. Lossos IS, Alizadeh AA, Rajapaksa R, et al. HGAL is a novel interleukin-4-inducible gene that strongly predicts survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003; 101:433-440.
35. Bea S, Zettl A, Wright G, 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; 106:3183-3190.
36. Rossé T, Olivier R, Monney L, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 1998; 391(6666):496-9.

37. Yang E, Korsmeyer SJ, Howard Hughes. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996; 88(2):386-401.
38. Wickremasinghe RG, Hoffbrand AV. Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood* 1999; 93(11):3587-600.
39. Visco C, Tzankov A, Xu-Monette Z, 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 DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica* 2013; 98(2):255-63.
40. Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE, et al. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol.* 2004;165(1):159-66.
41. Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, van Krieken JH et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 1998;92(9):3152-62.
42. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappa B activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med.* 2001;194(12):1861-74.
43. Maeshima A, Taniguchi H, Fukuhara S, et al. Bcl-2, Bcl-6, and the International Prognostic Index are prognostic indicators in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab containing chemotherapy. *Cancer Sci.* 2012 ;103(10):1898-904.
44. Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, Emile JF, Lederlin P, Sebban C et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2-associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood* 2003;101(11): 4279-84.
45. Yamamoto K, Matsuoka H, Yakushijin K, et al. A novel five-way translocation, t(3;9;13;8;14)(q27;p13;q32;q24;q32), with concurrent myc and bcl6 rearrangements in a primary bone marrow B-cell lymphoma. *Cancer Genetics* 2011; 204 : 501-506.
46. Jardin F, Ruminy P, Bastard C, et al. The BCL6 proto-oncogene: a leading role during germinal center development and lymphomagenesis. *Pathol Biol Paris.* 2007;55(1):73-83.

47. Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2-associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood* 2003;101:4279–84. 27.
48. Winter JN, Weller EA, Horning SJ, et al. Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. *Blood* 2006;107:4207–13.
49. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311-22.
50. Menke T, Boettcher K, Krüger S, et al. Ki-67 protein concentrations in urothelial bladder carcinomas are related to ki-67-specific RNA concentrations in urine. *Clinical Chemistry* 2004; 50(8): 1461-1463
51. Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin cancer biol* 1990; 1(3): 199-206.
52. 20. Ulusal Patoloji Kongresi, Moleküler Patoloji Kurs Notları, 2010.
53. Cell and Tissue based molecular pathology, Raymond R. Tubbs, Mark H. Stoler
54. Dako.com.tr
55. Mahjoub F, Shahsiah R. Detection of epstein barr virus by chromogenic in situ hybridization in cases of extra-hepatic biliary atresia. *Diagnostic Pathology* 2008; 3:19.
56. Cohen JJ. Epstein-Barr virus infection. *New England Journal of Medicine* 2000, 343:481-492.
57. Hassan R, White LR, Stefanoff CG, et al. Epstein-Barr virus (EBV) detection and typing by PCR: a contribution to diagnostic screening of EBV-positive Burkitt's lymphoma. *Diagnostic Pathology* 2006; 1:17-18.
58. Adam P, Bonzheim I, Fend F. Epstein-barr virus-positive diffuse large B-cell lymphomas of the elderly. *Adv Anat Pathol* 2011;18:349–355.
59. Chang C, Schroeder JC, Huang WY. Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) subtypes defined by common translocations: utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in a case-control study. *Leuk Res.* 2010; February; 34(2): 190.
60. Ventura RA, Martin-Subero JJ, Jones M. FISH Analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue, Review. *J. Mol. Diagnostics*; 2006;8(2):141-51.

61. Berglund M, Gunilla E, Flordal M, et al. Chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Mod Pathol*. 2002;15:807–816.
62. Ladanyi M, Offit K, Jhanwar SC, Filippa DA, Chaganti RSK. MYC rearrangement and translocations involving band 8q24 in diffuse large cell lymphomas. *Blood*. 1991;77:1057–1063.
63. McClure R, Remstein ED, Macon WR, et al. Adult b-cell lymphomas with Burkitt-like morphology are phenotypically and genotypically heterogeneous with aggressive clinical behavior. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1652–1660.
64. Aukema M, Siebert R, Schuurin E. Double hit b-cell lymphomas. *Blood* 2011; 117:2319-2331.
65. Lin P, Medeiros J. High-grade B-cell lymphoma/leukemia associated with t(14;18) and 8q24/MYC rearrangement: a neoplasm of germinal center immunophenotype with poor prognosis. *Haematologica* 2007; 92(10):1297-301.
66. Snuderl M, Kolman OK, Chen Y. B-cell Lymphomas with concurrent IgH-bcl2 and myc rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt Lymphoma and diffuse large b-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2010; 34(3): 327–340.
67. Bellan C, Stefano L, Giulia de F, et al. Burkitt lymphoma versus diffuse large B-cell lymphoma: a practical approach. *Hematol Oncol*. 2009; 27(4):182-5.
68. Zhao XF, Hassan A, Perry A. C-myc rearrangements are frequent in aggressive mature b-cell lymphoma with atypical morphology. *Int J Clin Exp Pathol* 2008; 1: 65-74.
69. Bodoor K, Matalka I, Hayajneh R, et al. Evaluation of bcl-6, CD10, CD138 and MUM-1 expression in diffuse large b-cell lymphoma patients: CD138 is a marker of poor prognosis, *Journal of cancer prevention* 2012; 13: 3037-3046.
70. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403, 503-11.
71. Lossos IS, Levy R (2003). Diffuse large B-cell lymphoma: insights gained from gene expression profiling. *Int J Hematol*, 77, 321-9.
72. Wright G, Tan B, Rosenwald A, et al. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 9991-6.

73. Goff LK, Clear AJ, Lister A, et al. The expression of bcl-2 by proliferating cells varies in different categories of b-cell lymphoma. *Histopathology*. 2010; 56(5):617-26.
74. Vitolo U, Gaidano G, Botto B. Rearrangements of bcl-6, bcl-2, c-myc and 6q deletion in diffuse large cell lymphoma: clinical relevance in 71 patients. *Ann Oncol* 1998;9:55-61.
75. Tomita N. Bcl-2 and myc dual hit lymphoma/leukemia review article. *J.clin exp hematopathol* 2011;51(1): 7-12.
76. Prevodnik VK, Lavrenčak J, Horvat M, et al. The predictive significance of CD20 expression in b-cell lymphomas. *Diagnostic Pathology* 2011, 6:33
77. Li ZM, Huang JJ, Xia Y. High Ki-67 expression in diffuse large B-cell lymphoma patients with non-germinal center subtype indicates limited survival benefit from R-CHOP therapy. *Eur J Haematol* 2012 ;88(6):510-7.
78. Shimoyama Y, Yamamoto K, Asano N. Age-related epstein–barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders: Special references to lymphomas surrounding this newly recognized clinicopathologic disease. Review article. *Japanese Cancer Association* 2008