

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

129999

**DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMALARDA
MORFOLOJİK ÖZELLİKLER ve
PTEN İMMÜNEKSPRESYONU**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Dr. Sevgen Çelik ÖNDER

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ayşegül Hasegeli ÜNER

ANKARA

2003

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim s¼recinde verdikleri destek ve g¼sterdikleri yakınlık i¼in Patoloji Anabilim Dalı BaŐkanı Sayın Prof. Dr. Bedri Uzunalimođlu hocam nezdinde t¼m hocalarıma, ağabey ve ablalarım,

Tez ¼alıŐmamdaki yardımları ve destekleri i¼in tez danıŐmanım Sayın Do¼. Dr. AyŐeg¼l Hasegeli Üner'e,

Ve, t¼m emek ve sabırları i¼in aileme minnet ve teŐekk¼rlerimi sunarım.



ÖZET

Önder, S. Diffüz büyük B hücreli lenfomalarda morfolojik özellikler ve PTEN immünoekspresyonu. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Tezi. Ankara, 2003. Diffüz büyük B hücreli lenfomalar (DBBHL) erişkinlerde görülen non-Hodgkin lenfomaların en büyük grubunu oluşturmaktadır. Lenfomaların etiyolojileri tam olarak bilinmemekle birlikte neoplastik patogeneizde genetik anomalilerin rol oynadığı gösterilmiştir. Bu genetik anomaliler içinde sıklıkla onkogenleri ilgilendiren gen rearanjmanları saptanmıştır. Tümör süpresör genlerin lenfomagenezdeki rolleri hakkındaki bilgiler ise daha azdır. Pek çok malign solid neoplazide kromozom 10q23'te lokalize bir tümör süpresör gen olan PTEN'i ilgilendiren çeşitli nokta mutasyonları veya delesyonlar bildirilmiştir. Bu çalışmada 102 DBBHL olgusunda immünohistokimyasal olarak PTEN ekspresyonu araştırılmıştır. Olguların yaklaşık üçte birinde PTEN immünoekspresyon kaybı saptanmıştır. Bulgular, PTEN gen anomalilerinin DBBHL olgularının bir kısmında neoplastik gelişim sürecinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Diffüz büyük B hücreli lenfoma, PTEN

ABSTRACT

Önder, S. Morphological characteristics and PTEN immunoexpression in diffuse large B-cell lymphomas. Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Medical Pathology, Ankara, 2003. Diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) constitute the largest subgroup of non-Hodgkin lymphomas (NHL) in adults. Although the etiology of NHL is not fully understood, different genetic abnormalities, involving particularly oncogenes, were shown as a mechanism of lymphomagenesis. Mutations of tumor suppressor genes, unlike oncogenes, have been relatively less studied in DLBCL. PTEN, a tumor suppressor gene located at 10q23, has been shown to be mutated or deleted in a variety of solid tumors. In this study, loss of PTEN expression was evaluated immunohistochemically in 102 DLBCL patients. Partial or complete loss of PTEN was detected in about one-third of the cases, leading us to the conclusion that it might contribute to the lymphomagenesis in some cases.

Keywords: Diffuse large B-cell lymphomas, PTEN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER VE RESİMLER.....	viii
TABLolar	ix
GİRİŞ.....	1
1.1. Amaç.....	1
1.2. Kapsam ve Yöntem.....	1
GENEL BİLGİLER	
2.1. B Hücreli Lenfomalar.....	2
2.1.1. B Hücreli Lenfomaların Tanımı ve Moleküler Genetik Anomaliler.....	2
2.1.2. Malign Lenfoma Sınıflamaları.....	5
2.2. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomalar.....	8
2.2.1. WHO Sınıflamasına göre DBBHL Morfolojik Varyantları.....	9
2.2.2. WHO Sınıflamasına göre DBBHL Altıpleri.....	11
2.3. İncelenen İmmünohistokimyasal Belirleyiciler Hakkında Genel Bilgiler.....	12
2.3.1. PTEN.....	12
2.3.2. Bcl-2.....	16
2.3.3. CD20.....	17
2.3.4. CD30.....	17
2.3.5. EMA.....	18
2.3.6. Ki-67.....	18
GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1. Olgular ve Doku Örnekleri	19
3.2. İmmünohistokimya.....	19
3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme.....	20
3.4. İstatistiksel Analiz.....	21
BULGULAR	
4.1. Olguların Klinik Özellikleri.....	22
4.2. Morfolojik Tiplerin Lokalizasyon, İmmünofenotipik ve Sağkalım Özellikleri.....	23
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	26
4.4. Sağkalım ile Morfolojik ve İmmünofenotipik Özellikler Arası İlişki.....	30
4.4.1. Sağkalım ve Bcl-2 Ekspresyonu.....	31
4.4.2. Sağkalım ve PTEN Ekspresyonu.....	32
TARTIŞMA.....	33
SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	42
KAYNAKLAR.....	43
EK 1: Lenfoid Hücre Neoplazmalarının WHO Sınıflaması.....	53
EK 2: Olgu Listesi.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DBBHL	Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma
EBV	Epstein-Barr Virüs
EMA	Epitelyal Membran Antijen
H&E	Hematoksilen- Eozin
HHV-8/KSHV	İnsan Herpesvirüsü-8/Kaposi Sarkomu Herpes Virüs
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
Ig	İmmünoglobulin
IgH	İmmünoglobulin Ağır Zincir
IgL	İmmünoglobulin Hafif Zincir
NHL	Non-Hodgkin Lenfoma
p	<i>Probability</i>
P3K	Fosfoinozid-3-kinaz
PIP3	Fosfatidilinozitoltrifosfat
REAL	Revised European-American Lymphoma
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER VE RESİMLER

Şekil	Sayfa
2.1. P3K/PTEN/Akt yolağı.....	14
4.1. Sentroblastik ve sentroblastik dışı olgularda PTEN kaybı.....	30
Resim	
4.1. Olguların WHO Sınıflamasına göre histomorfolojik tipleri.....	25
4.2. Bazı olgularda CD30, EMA, Ki-67 ve bcl-2 immünekspresyonu.....	28
4.3. PTEN immünekspresyonu.....	29



TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. B ve T/NK hücreli lenfomaların görülme sıklığı.....	2
2.2. B hücreli lenfomalarda görülen bazı kromozom translokasyonları.....	4
2.3. Rappaport sınıflaması.....	5
2.4. Kiel sınıflaması.....	6
2.5. Working Formulation.....	7
2.6. WHO Sınıflamasına göre DBBHL morfolojik varyantları ve alttipleri.....	9
2.7. PTEN geninde mutasyonu gösterilmiş bazı kodonlar.....	15
3.1. İmmünohistokimyasal çalışmalarda kullanılan primer antikorlar.....	19
4.1. Olguların bazı klinik özellikleri.....	22
4.2. Olguların WHO sınıflamasına göre histomorfolojik olarak dağılımı.....	23
4.3. DBBHL histomorfolojik tiplerine göre immünohistokimyasal bulgular.....	26
4.4. PTEN ekspresyonunun histomorfolojik tiplere göre dağılımı.....	29
4.5. Sağkalım oranlarının histomorfolojik tiplere göre dağılımı.....	31
4.6. Sağkalım ve bcl-2 ekspresyonu.....	31
4.7. Sağkalım ve PTEN ekspresyonu.....	32

GİRİŞ

1.1. Amaç

B hücreli non-Hodgkin lenfomaların (NHL) üçte birinden fazlasını oluşturan Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomalar (DBBHL), REAL/WHO sınıflamasına göre histomorfolojik görünümleri birbirinden farklı büyük neoplastik B hücrelerinden meydana gelen lenfomaların birarada toplandığı heterojen bir lenfoma grubudur. Bu grup içerisinde yer alan lenfomalar köken aldıkları hücreler, taşıdıkları moleküler genetik anomaliler ve biyolojik davranışları açısından da çeşitlilik göstermektedir. Etiyopatogenezleri tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, B hücreli lenfomalarda neoplastik transformasyondan sorumlu tutulan pek çok genetik anomali saptanmıştır. Bu genetik anomaliler içerisinde en sık onkogen aktivasyonuna yol açan kromozom translokasyonları gösterilmiştir. Lenfomagenezde tümör süpresör gen anomalilerin rolü göreceli olarak daha az çalışılmış bir konudur.

Bu çalışmada diffüz büyük B hücreli lenfomalarda bir tümör süpresör gen olan PTEN'in immünohistokimyasal yöntemlerle ekspresyonu araştırılmış, PTEN immünkaybının DBBHL patogenezindeki rolü ve sağkalım üzerindeki etkisi tartışılmıştır. Olguların ayrıca histomorfolojik ve bcl-2, CD30, EMA, ve Ki-67 ekspresyonuna yönelik immünofenotipik özellikleri incelenmiş, prognostik önemleri değerlendirilmiştir.

1.2. Kapsam ve Yöntem

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında 1999-2002 yılları arasında diffüz büyük B hücreli lenfoma tanısı alan 102 olguya ait biyopsi örnekleri yeniden gözden geçirilmiştir. Olgular REAL/WHO sınıflamasına göre tekrar kategorize edilmiş ve ardından PTEN, bcl-2, CD20, CD30, EMA ve Ki-67'ye yönelik immünohistokimyasal boyamalar yapılmıştır. Histolojik ve immünohistokimyasal bulgular iki ayrı patolog tarafından değerlendirilmiştir.

GENEL BİLGİLER

2.1. B Hücreli Lenfomalar

2.1.1. B Hücreli Lenfomaların Tanımı ve Moleküler Genetik Anomaliler

B-hücreli non-Hodgkin lenfomalar, matür B hücrelerinden plazma hücrelerine kadar herhangi bir diferansiasyon aşamasındaki B lenfositlerin klonal çoğalması sonucu meydana gelen neoplazmlardır ve tüm lenfoid neoplazmların %90'dan fazlasını oluşturmaktadır. Tüm dünyada her yıl meydana gelen yeni malignitelerin yaklaşık %4'ünü lenfomalar teşkil etmektedir. Yıllık insidansı Amerika Birleşik Devletleri'nde 15/100,000'dir. Oldukça heterojen bir hastalık grubunu temsil eden NHL'lerin en sık görülen tipleri diffüz büyük B hücreli lenfomalar ve folliküler lenfomalardır ve sadece bu iki tip, tüm NHL olgularının %50'den fazlasını meydana getirmektedir^{1,2} (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. B ve T/NK hücreli lenfomaların görülme sıklığı.²

Lenfoma Tipi	Sıklık (%)
Diffüz büyük B hücreli lenfoma	30,6
Folliküler lenfoma	22,1
MALT lenfoma	7,6
Matür T hücreli lenfomalar (ABHL hariç)	7,6
Kronik lenfositik lösemi/ küçük lenfositik lenfoma	6,7
<i>Mantle</i> hücreli lenfoma	6,4
Mediastinal büyük B hücreli lenfoma	2,4
Anaplastik büyük hücreli lenfoma	2,4
Burkitt lenfoma	2,5
Nodal marjinal zon lenfoma	1,8
Prekürsör T lenfoblastik lenfoma	1,7
Lenfoblastik lenfoma	1,2
Diğer	7,4

MALT; *Mucosa-associated lymphoid tissue*, ABHL; Anaplastik büyük hücreli lenfoma

B hücreli lenfomalar bimodal yaş dağılımı göstermektedirler. Ortalama 6. ve 7. dekadlarda görülmekle birlikte Burkitt lenfoma ve büyük B hücreli lenfomalar önemli bir oranda çocukluk yaş grubunda da ortaya çıkmaktadır. Erkeklerde biraz daha sık görülmektedir.²

Lenfomaların etiyojisi tam olarak aydınlanmamış olmakla birlikte bazı lenfoma tiplerinde etiyopatogenezde rol oynayabilecek çeşitli enfeksiyöz ajanlar ve immün yetmezlik durumları gösterilmiştir. Epstein-Barr virüsü (EBV) Burkitt lenfomada, İnsan Herpesvirüs-8 (HHV-8)/ Kaposi Sarkomu Herpervirüs (KSHV) primer effüzyon lenfomasında, Hepatit C virüsü lenfoplazmasitik lenfomada, H. pylori gastrik MALT lenfomalarda etiyopatogenezde önemli olduğu düşünülen enfeksiyöz etkenlerin bazılarıdır.²

B hücreli lenfomaların çoğunda genetik bir anomali gösterilmiştir. Genetik bozukluklar lenfoid hücrelerinin diferansiasyon aşamalarının herhangi bir evresinde meydana gelebilmektedir. Bu genetik anomalilerden karakteristik olan bazılarının tespiti ile hem lenfomaların ayırıcı tanıları yapabilmek, hem de bazı lenfoma olgularının biyolojik davranışlarını önceden kestirebilmek mümkün olmaktadır. Lenfomalarda, diğer pek çok malign neoplazide olduğu gibi temel olarak üç grup genin etkilendiği gösterilmiştir. Bunlar onkogenler, tümör süpresör genler ve apoptozisi düzenleyici genlerdir.

Onkogenleri ilgilendiren genetik anomalilerde kromozom translokasyonları, nokta mutasyonlar, gen amplifikasyonları ve retroviruslerin etkisi gibi çeşitli mekanizmalar sonucunda onkogen aktivasyonu meydana gelmekte ve ardından hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalmaktadır. B hücreli NHL'lerde en sık görülen kromozom anomalileri immünglobulin (Ig) genleri ve onkogenler arasında meydana gelen translokasyonlar ve buna bağlı onkogen aktivasyonlarıdır. Sonuçta, B hücrelerinde Ig ağır (IgH) ve hafif (IgL) zincirlerinin transkripsiyonu sırasında aynı zamanda Ig geni komşuluğuna transloke olan onkogenin ürününün de aberan transkripsiyonu sağlanmaktadır. IgH geni 14. kromozom, IgL kappa ve lambda genleri ise sırasıyla 2 ve 22 no'lu kromozomlarda bulunmaktadır. Malign lenfomalarda sitogenetik yöntemlerle bu üç Ig gen lokusunu ilgilendiren pek çok translokasyon gösterilmiştir. Bunlardan karakteristik olan bazıları Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. B hücreli lenfomalarda görülen bazı kromozom translokasyonları.

Lenfoma Tipi	Translokasyon	Onkogen	Onkogen Özelliği
Burkitt	t(8;14), t(2;8) ve t(8;22)	myc	Transkripsiyon faktörü
Foliküler	t(14;18)	bcl-2	Apoptozis inhibitörü
<i>Mantle</i> hücreli	t(11;14)	bcl-1 (cyclin-D1)	Hücre siklus regülatörü
Lenfoplazmasitik	t(14;19)	bcl-3	Transkripsiyon faktörü
DBBHL	t(3;14), t(3;22) t(14;18) t(8;22)	bcl-6 bcl-2 myc	Transkripsiyon faktörü Apoptozis inhibitörü Transkripsiyon faktörü

Non-Hodgkin lenfomaların %80-90'ında böyle bir translokasyon anomalisi mevcuttur. B hücreli lenfomalarda en sık 18q21 lokusundaki bcl-2, 8q24 lokusundaki myc ve 3q27 lokusundaki bcl-6 onkogenlerini ilgilendiren translokasyonlar tespit edilmiştir. Bu üç onkogeni ilgilendiren translokasyonlar DBBHL'lerin yaklaşık %50'sinde saptanmıştır.³

Tümör süpresör genlere bağlı neoplastik transformasyon sürecinde ise klasik olarak tümör süpresör genin önce bir allelinde mutasyon meydana gelmektedir. Daha sonra karşı allelin kaybı ile malign transformasyona kadar ilerleyen selektif bir proliferasyon süreci başlamaktadır. İkinci allelin kaybı (heterozigosite kaybı, *loss of heterozygosity*) sıklıkla geniş bir kromozom bölgesini ilgilendiren delesyonlar sonucu meydana gelmektedir. Heterozigosite kaybı delesyonlar yanısıra genom üzerinde nokta mutasyonlar veya insersiyon gibi mekanizmalarla da meydana gelebilmektedir. Tümör süpresör genlerin malign lenfoma patogenezindeki rolleri onkogenlere oranla daha az araştırılmış bir konudur. Son yıllarda tanımlanmış yeni bir tümör süpresör gen olan PTEN'i ilgilendiren mutasyonlar daha çok solid neoplazmlarda saptanmış olmakla birlikte çeşitli B ve T hücreli NHL olgularında da bildirilmiştir.

2.2 Malign Lenfoma Sınıflamaları

Lenfoma sınıflaması uzun yıllar boyunca patoloğların ve klinisyenlerin arasında farklı görüş ve öneriler nedeniyle tartışma konusu olmuştur. 1960'lı yıllarda, ilk sınıflamalardan birisi olan Rappaport Sınıflaması esas olarak neoplazmın morfolojik özelliklerine göre yapılmıştır⁴ (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Rappaport Sınıflaması

Nodüler lenfomalar	Diffüz lenfomalar
İyi diferansiye lenfositik	İyi diferansiye lenfositik
Kötü diferansiye lenfositik	Kötü diferansiye lenfositik
Mikst lenfositik ve histiyositik	Mikst lenfositik ve histiyositik
Histiyositik	Histiyositik
İndiferansiye	İndiferansiye
Hodgkin lenfoma	Hodgkin lenfoma

Daha sonraki yıllarda, 1974'te Karl Lennert tarafından Almanya, Kiel'de yapılan ve 1988'de güncelleştirilen Kiel sınıflamasında neoplastik hücrelerin normalde karşılık geldikleri hücreler gözönüne alınmıştır^{5,6} (Tablo 2.4). Avrupa'da çok kabul gören Kiel sınıflamasında lenfomaların gelişim paterninden çok hücreli içeriği ve lenfositik diferansiyasyon derecesi dikkat çekmektedir. Neoplazmı oluşturan hücrelere verilen *-sitik*, *-sitoid* ve *-blastik* soneklere ile lenfomalar hem değişik morfolojik tiplere, hem de bu morfolojik tiplerin karşılık geldiği, sırasıyla düşük ve yüksek dereceli lenfomalara ayrılmıştır. Bu sınıflamada, daha sonra REAL sınıflamasında DBBHL olarak kategorize edilecek sentroblastik, B-immünoblastik ve büyük B hücreli anaplastik olmak üzere üç ana lenfoma grubu da tanımlanmıştır.

Kiel sınıflaması, lenfomaların gelişim paterninin nodüler yada diffüz olmasının önemli bir prognostik parametre olduğuna inanan Amerikalı otörler tarafından çok kabul görmemiştir. Çünkü Kiel sınıflaması hem yeni terminolojisiyle değişik lenfomalar tanımlamış, hem de nodüler (folliküler) lenfomalar ile diffüz lenfomaları ayrı birer başlık olarak içermemiştir. Nodüler (folliküler) lenfomaların daha iyi prognozlu olması ve Amerika Birleşik Devletleri'nde daha sık görülmesi nedeniyle, Amerikalı patoloğ ve klinik onkoloğlar tarafından 1982 yılında

lenfomaların derecelerine göre yeni bir sınıflama yapılmıştır. Working Formulation adı verilen bu sınıflamada lenfomalar, hastalığın klinik seyrine göre düşük, orta ve yüksek dereceli olarak üç kategoriye ayrılmıştır. Sınıflamada aynı zamanda hem lenfomaların gelişim paternine, hem de hücre morfolojilerine yer verilmiştir⁷ (Tablo 2.5). Ancak neoplastik lenfoid hücrelerin immünofenotipik özelliklerini gözardı eden bu sınıflama da tartışmalara yol açmıştır.

Tablo 2.4. Kiel Sınıflaması

B hücreli lenfoma	T hücreli lenfoma
Düşük dereceli	
Lenfositik KLL <i>Hairy cell</i> lösemi Lenfoplazmositoid/sitik (immünositoma) Plazmasitik Sentroblastik/sentrositik Sentrositik	Lenfositik KLL Küçük serebriform Lenfoepiteloid (Lennert) Angioimmünoblastik T-zone Pleomorfik, küçük hücreli
Yüksek dereceli	
Sentroblastik İmmünoblastik Lenfoblastik Burkitt lenfoma Anaplastik büyük hücreli (Ki-1 ⁺)	Pleomorfik, orta-büyük hücreli İmmünoblastik Lenfoblastik Anaplastik büyük hücreli (Ki-1 ⁺)

KLL: kronik lenfositik lösemi

Patologların morfolojik bulguların yanısıra neoplazmların immünofenotipik ve hatta son yıllarda moleküler genetik özelliklerini de ortaya çıkarıp tanıların kesinleştirebilmeleri, pek çok neoplazmda olduğu gibi lenfomaların da değişik alttiplerini tanımlamalarına yol açmıştır. Bunun üzerine 1994 yılında Uluslararası Lenfoma Çalışma Grubu, daha önce literatürde bildirilmiş olan lenfoma tipleriyle birlikte yeni tanımlanmış antiteleri de içine alan çok kapsamlı yeni bir lenfoma sınıflamasını sunmuştur. Önceki Avrupa ve Amerikan sınıflamalarını kapsayan bu yeni sınıflandırmaya REAL (Revised European-American Lymphoma) adı

verilmiştir.⁸ REAL sınıflamasının önceki sınıflamalardan bir farkı da bunun sadece bir hastalık gruplandırması değil, aynı zamanda tüm lenfoma antitelerinin bir derlemesi niteliği taşımasıdır. Burada neoplazmlar biyolojik davranışlarının benzerliklerine göre gruplandırılmamış, morfolojik, immünofenotipik ve genetik özelliklerine ve normal hücre karşılıklarına göre ayrı hastalıklar olarak listelenmiştir. Bu liste en son Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından gözden geçirilmiş ve güncellenmiştir^{9,10} (Bkz. EK 1).

Tablo 2.5. Working Formulation

Düşük dereceli lenfoma
Küçük lenfositik KLL ile uyumlu Plazmasitoid Foliküler, küçük çentikli hücreli Foliküler, mikst küçük çentikli ve büyük hücreli
Intermediate dereceli lenfoma
Foliküler, büyük hücreli Diffüz, küçük çentikli hücreli Diffüz, mikst küçük ve büyük hücreli Diffüz, büyük hücreli Çentikli hücreli Çentiksiz hücreli
Yüksek dereceli lenfoma
Büyük hücreli, immünoblastik Plazmasitoid <i>Clear cell</i> Polimorfik Lenfoblastik Küçük çentiksiz hücreli Burkitt Burkitt dışı

KLL: kronik lenfositik lösemi

WHO sınıflamasında en büyük grubu Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomalar oluşturmaktadır. Working Formulation'daki diffüz büyük hücreli, diffüz mikst

hücreli ve immünoblastik lenfomalar ile Kiel sınıflamasındaki diffüz sentroblastik, diffüz sentroblastik veya sentrositik ve immünoblastik lenfomalar bu başlık altında yer almaktadır. REAL sınıflamasında bulunmayan üç lenfoma tipi (Mediastinal Büyük B Hücreli Lenfoma, İntravasküler Büyük B Hücreli Lenfoma ve Primer Effüzyon Lenfoması) WHO tarafından DBBHL'ler içine üç yeni antite olarak eklenmiştir. Böylece lenfoblastik lenfoma ve Burkitt lenfoma dışındaki bütün agresif B hücreli lenfomalar DBBHL başlığı altında toplanmıştır. B hücreli non-Hodgkin lenfomaların en kalabalık grubunu oluşturan bu grup klinik, morfolojik, immünfenotipik ve moleküler genetik farklılıklar açısından da en heterojen grubunu temsil etmektedir.

2.2. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomalar

Diffüz büyük B hücreli lenfomalar nükleusları normal lenfositlerin iki katından daha büyük veya en az histiyosit nükleusu büyüklüğündeki neoplastik B hücrelerinin diffüz proliferasyonu sonucu meydana gelen non-Hodgkin lenfoma grubudur. Veziküle nükleuslu, nükleolleri belirgin, bazofilik sitoplazmalı ve orta-yüksek proliferasyon indeksine sahip hücrelerden oluşan DBBHL, erişkinlerde B hücreli non-Hodgkin lenfomaların %30'dan fazlasını oluşturur. Hastalığın görülme yaşı geniş bir spektruma sahip olmakla birlikte ortalama 7. dekattır ve erkeklerde biraz daha siktir. Çocukluk çağında da görülebilir.¹ Hastalığın ilk prezentasyonu daha çok nodal olup %40 olguda ektranodal bir odakta ortaya çıkar. Ekstranodal lokalizasyonlar içerisinde, sıklık sırasına göre, gastrointestinal sistem, deri, santral sinir sistemi, kemik, testis, yumuşak doku, kadın genital sistemi, akciğer, böbrek, karaciğer, dalak ve diğer organlar yer alır. Kemik iliği ender olarak primer odaktır.²

Hastalık çoğunlukla *de novo* (primer) olarak meydana gelmektedir. Ancak kronik lenfositik lösemi/küçük lenfositik lenfoma, folliküler lenfoma, marjinal zon lenfoma ve nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfoma gibi daha az agresif olan başka lenfomaların progresyonu sonucunda sekonder olarak da gelişebilmektedir.

Hastalık tipik olarak nodal veya ektranodal bir odakta hızlı büyüyen kitle şeklinde klinik bulgu vermektedir. Tanı anında olguların yarısı evre III ve IV'tür. Hastaların üçte ikisinden fazlasında ağrısız periferik lenf nodu büyümesi mevcuttur. Kilo kaybı, ateş, gece terlemesi gibi sistemik şikayetler daha çok ektranodal yerleşimli hastalıkta görülmektedir. Agresif bir klinik seyire sahip olmalarına karşın

kemoterapiye iyi yanıt veren DBBHL, orta (*intermediate*) dereceli NHL olarak kabul edilmektedir. Pek çok seriye göre modern kemoterapötik ajanlarla tam remisyon oranları %50'lere ve uzun dönem hastaliksız sağ kalım oranları % 70'lere kadar varmaktadır.¹¹⁻¹³

REAL ve WHO sınıflamasında DBBHL ortak başlığı altında toplanan lenfomalar hem histomorfolojik olarak, hem de taşıdıkları moleküler genetik, bazı immünojenotipik ve biyolojik özellikler bakımından farklılıklar göstermektedir. Son yıllarda gelişmekte olan *microarray* teknolojisi ile lenfomalarda yapılan çalışmalarda morfolojik olarak DBBHL kategorisine giren lenfomaların gen ekspresyon profillerinin de birbirinden farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir.¹⁴

2.2.1. WHO Sınıflamasına göre DBBHL Morfolojik Varyantları

Tüm DBBHL'ler transforme olmuş büyük lenfoid hücrelerden meydana gelmektedir. Ancak neoplastik hücrelerin değişik histomorfolojik görünüşleri nedeniyle WHO tarafından bazı morfolojik varyantlar tanımlanmıştır. Ayrıca, kendilerine özgü klinikopatolojik özelliklerinden dolayı üç yeni lenfoma tipi WHO tarafından ayrı birer antite kabul edilerek DBBHL başlığı altına alttipler olarak dahil edilmiştir² (Tablo 2.7).

Tablo 2.6. WHO Sınıflamasına göre DBBHL morfolojik varyantları ve alttipleri.

Morfolojik varyantlar
Sentroblastik
İmmünoblastik
Anaplastik
T hücresinden/histiositten zengin
Burkitt benzeri
Plazmablastik
Lenfomatoid granulomatosis
Alt tipler
Mediastinal (Timik) Büyük B Hücreli Lenfoma
Primer Effüzyon Lenfoması
İntravasküler Büyük B Hücreli Lenfoma

Sentroblastik Tip: Bu varyantı oluşturan hücreler histomorfolojik olarak reaktif lenf nodunun germinal merkezlerinde proliferen olan sentroblastlara (büyük çentiksiz hücrelere) benzerler. Hücreler 10-14µm çapta olup, yuvarlak-oval veziküle nükleuslara ve ince kromatin yapısına sahiptir. Tipik olarak iki-dört adet ve nükleer membrana yapışık nükleolus içerirler. Sitoplazmaları bazofilik ve dardır. Sentroblastlarla karışık olarak arada immünoblast benzeri hücreler de bulunabilir. Sentroblastik varyant sadece sentroblastları içeren monomorfik bir görünüm yanısıra, immünoblastların da eşlik etmesiyle polimorfik bir görünümde olabilir ancak immünoblastların oranı %90'ın altındadır.

İmmünoblastik Tip: Daha az sıklıkta görülen bu varyanttaki neoplastik hücrelerin %90'ından fazlasını immünoblastlar oluşturmaktadır. İmmünoblastlar sentroblastlara göre daha geniş ve bazofilik sitoplazmalı, yuvarlak nükleuslu ve santral yerleşimli tek nükleolus içeren hücrelerdir. Plazmasitoid diferansiyasyon görülebilir. Sentroblastlar eşlik edebilir ancak bu oran neoplastik hücre popülasyonunun %10'unu aşmaz. Sentroblastik varyant ile karşılaştırıldığında olguların sağkalım sürelerinin çok daha kısa olduğunu iddia eden bazı araştırmacılara göre immünoblastik tip lenfomalar en agresif seyirli DBBHL grubunu temsil etmektedir.¹⁵⁻¹⁷

T Hücrelerinden/Histiyosit Zengin Tip: Bu varyantı oluşturan neoplastik hücreler sentroblast veya immünoblast morfolojisinde büyük B hücrelerdir ve neoplazm içerisinde yaygın, reaktif, küçük T hücre komponenti ve/veya histiyositler mevcuttur.¹⁸ T hücreleri (± histiyositler) hücre popülasyonunun çoğunu oluştururken neoplastik büyük B hücrelerinin oranı %10'u aşmaz.¹⁹ Neoplastik hücrelerde lenfohistiyositik (L&H) veya Reed-Sternberg hücrelerine benzer morfoloji görülebilir.

Anaplastik Tip: Bu varyant (anaplastik büyük B-hücreli lenfoma) pleomorfik nükleuslara sahip geniş sitoplazmalı, büyük, anaplastik morfolojide hücrelerden meydana gelir. Neoplastik hücreler olguların çoğunda CD30 ile pozitif immünreaksiyon verdiğinden, bu grup Ki-1 veya CD30⁺ lenfoma olarak da bilinmektedir.²⁰⁻²¹

Lenfomatoid Granülomatozis: Başta akciğerler ve deri olmak üzere çeşitli lenfoid olmayan dokularda görülen anjiyosentrik ve anjiodestrüktif bir lenfoproliferatif hastalıktır.²²⁻²³ Lezyonun karakteristik histolojik triadı vardır: 1) küçük lenfositler, plazma hücreleri ve atipik, orta büyüklükte veya büyük hücreleri içeren polimorfik bir lenfoid hücre infiltrasyonu; 2) arter ve venlerin duvarında transmural mononükleer hücre infiltrasyonu ile karakterize anjiitis; ve 3) lenfoid nodüllerde gerçek granulom oluşumundan ziyade granülomatozis olarak adlandırılan nekroz. Hastalığın patogenezinde EBV'nin de rol aldığı gösterildiğinden²⁴ *anjiyosentrik/anjiodestrüktif T-hücreden zengin, EBV-ilişkili B-hücreli lenfoma* olarak da adlandırılmıştır.

Plazmablastik Tip: Daha çok İnsan İmmünyetmezlik Virüsü (HIV) taşıyıcılarında görülen ve özellikle başta gingiva olmak üzere daha çok oral kavite mukozasını tutan bu lenfoma tipini oluşturan hücreler, morfolojik olarak immünoblastlara, immünfenotip olarak ise plazma hücrelerine benzemektedir.²⁵ Neoplastik hücreler B immünoblast ile plazma hücresi arasındaki bir differansiasyon basamağında olup immünhistokimyasal olarak B hücre belirleyicilerinden CD20 ve CD45 ile zayıf, ancak plazma hücresi belirleyicileri olan CD79a ve VS38C ile kuvvetli reaksiyon verirler.

2.2.2. WHO Sınıflamasına göre DBBHL Altıpteri

Farklı immünfenotipik, genetik ve klinik özellikleri ile yeni tanımlanmış olan üç antite WHO tarafından DBBHL'lerin altıpteri olarak sınıflandırılmıştır (Tablo 2.7).

Mediastinal (Timik) Büyük B-Hücreli Lenfoma: Primer olarak mediastinal yerleşimli olan ve büyük B hücrelerinden meydana gelen bu lenfoma kendine özgü klinik ve patolojik özellikler taşımaktadır.²⁶ Sıklıkla genç erişkinlerde ve kadınlarda görülmektedir ve klinik olarak büyük mediastinal bir kitle şeklinde ortaya çıkmaktadır. Histolojik olarak lezyon sentroblast benzeri hücrelerin diffüz proliferasyonu şeklinde görülür. Hücre grupları arasında karakteristik fibrozis mevcuttur. Reed-Sternberg benzeri polilobe hücreler görülebilir. Neoplastik hücrelerin karakteristik bir özelliği de sitoplazmalarının berrak oluşudur. Bu berrak görünümünden dolayı B hücreli primer mediastinal *clear cell* lenfoma olarak da adlandırılmıştır.²⁷ Bazı olgularda neoplazi çevresinde rezidü timus dokusu izlenmesi

ve neoplastik hücrelerin intramedüller timik B hücreleri gibi immüfenotipe sahip olması,²⁸ neoplastik hücrelerin timus kökenli olabileceğini düşündürmektedir. Bu lenfomanın biyolojik seyri diğer DBBHL varyantlarından pek farklılık göstermemektedir.

Primer Effüzyon Lenfoması: Az rastlanan ve solid tümör kitlesi oluşturmadan seröz vücut boşluklarında ortaya çıkan bu lenfoma hemen daima HIV ile enfekte kişilerde görülür.² Olguların tümünde neoplastik hücrelerde HHV-8 saptanmıştır.²⁹ Bu lenfomalar köken aldıkları vücut boşluklarında sınırlı kalmakta ve nadiren lenf nodlarına yayılmaktadır. Tutulum yerleri en sık plevral, perikardiyal ve peritoneal boşluklar olup tipik olarak bu vücut boşluklarından sadece bir tanesi tutulmaktadır. Neoplastik hücreler anaplastik veya immünoblastik morfolojidedir. HHV-8 enfeksiyonu tanı için olmazsa olmaz bir kriterdir. Prognozu son derece kötüdür.

İntravasküler Büyük B -Hücreli Lenfoma: İntravasküler büyük B-hücreli lenfoma, nadir görülen agresif bir DBBHL varyantıdır. Neoplastik lenfoid hücreler sadece damarların, özellikle kapillerlerin içinde sınırlıdır. Sıklıkla deri veya beyin damarlarının oklüzyonuna ikincil semptomlar ile klinik verirler. Prognozu son derece kötüdür.²

2.3. İncelenen İmmünohistokimyasal Belirleyiciler Hakkında Genel Bilgiler

2.3.1. PTEN

PTEN 10q23 lokusunda lokalize bir tümör süpresör genidir.³⁰⁻³² Gen ürünü olan 403 amino asitlik PTEN molekülü, protein tirozin fosfataz ailesine üye bir proteindir. PTEN hem protein, hem de lipid fosfataz özelliğine sahip bir dual fosfatazdır³³ ve bir enzimatik fonksiyonu olduğu bilinen ilk tümör süpresör moleküldür. PTEN, reseptör tirozin kinazlar tarafından hücre içine aktarılan ve daha sonra fosfoinozimid-3-kinaz (PI3K) aracılığı ile nükleusa ulaştırılan sinyal iletimi yolağında işlev görmektedir. PTEN, lipid fosfataz aktivitesi ile bu yolaktaki PI3K ürünleri olan fosfatidilinozitoltrifosfatları (PIP3) defosforile etmekte ve hücre çoğalmasını uyuracak stimulusların nükleusa iletilmesini engellemektedir.

PTEN'in bir başka özelliği de hücre iskeleti proteinlerinden tensin ve auxilin ile sekans homolojisi taşımasıdır. Tensin, fokal adhezyonlarda aktin filamentlerine bağlanan ve integrin-aracılı hücre adhezyonunda rol alan bir hücre iskeleti

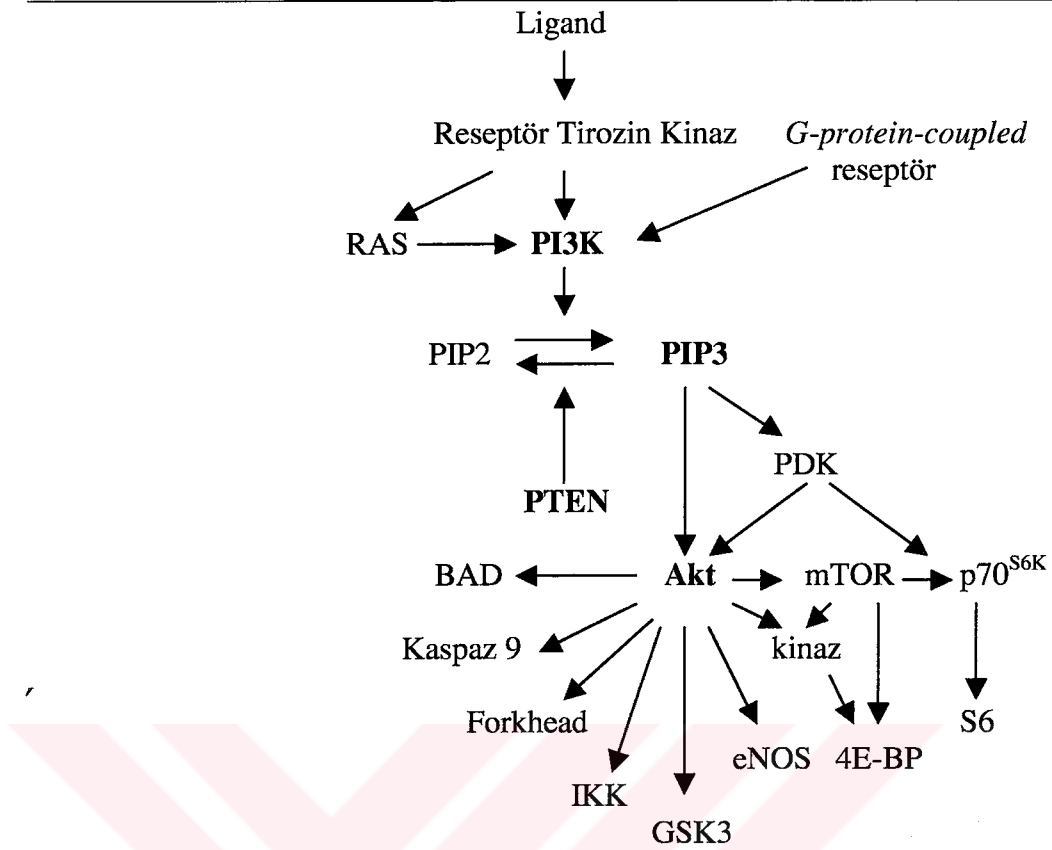
proteinidir. PTEN, protein tirozin fosfataz aktivitesi ile fosforile tirozin, serin ve treonin aminoasitlerini (fosfotirozil, fosfoseril ve fosfotreonil rezidülerini) parçalamaktadır. Bu grup proteinlerden bir tanesi fokal adhezyonlarda hücreler arası etkileşimde önemli bir molekül olan Fokal Adhezyon Kinazdır (FAK). FAK defosforilasyonuna neden olana PTEN, fokal adhezyonda integrin-aracılı hücre sinyalleşmesini inhibe ederek hücre-ekstraselüler matriks ilişkilerini ve hücre yayılmasını selektif olarak bozmaktadır³⁴.

Adını fosfataz fonksiyonu ve tensin homolojisi özelliklerinden alan PTEN (*Phosphatase and tensin*), ilk çalışmalar sırasında farklı araştırmacılar tarafından MMAC1 (*mutated in multiple advanced cancer*) ve TEP-1 (*TGFβ-regulated and epithelial cell-enriched phosphatase*) olarak da adlandırılmıştır.

Ekstraselüler sinyaller hücre nükleusuna çeşitli sitoplazmik yollarla iletilir. Hücre büyümesini ve çoğalmasını uyarın insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) gibi bazı büyüme faktörleri ve çeşitli sitokinler, uyarılarını hücre içine Reseptör Tirozin Kinaz aracılığıyla iletmektedir. Bu uyarıcı stimuluslar daha sonra PI3K/Akt yoluyla³⁵ ile hücre nükleusuna ulaşmaktadır (Şekil 2.1).

Hücre uyarıcı sinyaller ile aktive olan PI3K, fosfotidilinozitolbifosfatı (PIP2) fosforilleyerek membranla ilişkili bir lipid medyatör olan PIP3'e çevirir. Bir ikincil mesaj molekülü olan PIP3 ise bir onkoprotein olan serin-treonin protein kinaz Akt molekülünü aktive eder. Protein kinaz B olarak da bilinen Akt aktive olduktan sonra intrasitoplazmik pek çok kinazın, transkripsiyon faktörünün ve regülatör molekülün fosforilasyonunu gerçekleştirerek hücreye gelen uyarıcı sinyallerin nükleusa iletilmesini sağlamış olur.

Çeşitli sitokinler, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) gibi bazı büyüme faktörleri ve hücrelerin ekstraselüler matrikse teması gibi bir takım hücre-matriks ilişkileri, özellikle tirozin kinaz aktivitesine sahip olan membran reseptörlerinin uyarılmasına neden olarak PI3K/Akt yoluyla üzerinden glüköz metabolizması gibi bazı metabolik olayların yanısıra hücre bölünmesi ve çoğalmasını sağlayan proliferatif süreçleri başlatmaktadır. Hücre siklusu üzerindeki bu proliferatif etkileri yüzünden PI3K/Akt yoluyla çeşitli neoplastik süreçlerden de sorumlu tutulmaktadır.



Şekil 2.1. PI3K/PTEN/Akt yolağı.³⁵ PDK: fosfoinozitid-*dependent* kinaz; GSK3: glikojen sentaz 3; p70^{S6K}: ribozomal protein S6 kinaz; BAD: bcl-2, bcl_{XL} antagonisti; IKK: IκB kinaz; eNOS: endotelial nitrik oksid sentaz; mTOR: *mammalian target of rapamycin*; 4E-BP: *eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein*.

PTEN lipid fosfataz fonksiyonu ile PIP2 ve PIP3'leri defosforile ederek inaktifleştirir ve dolayısıyla PIP3 tarafından Akt aktivasyonunu engelleyerek hücre içi proliferatif sinyallerin iletimini ve hücre siklusunun ilerlemesini inhibe eder.³⁶ PTEN fonksiyonu olmayan hücrelerde PIP3 seviyelerinin iki kat kadar arttığı gösterilmiştir.^{37,38} PTEN'in tümör süpresör özelliği bu lipid fosfataz fonksiyonundan gelmektedir.³⁹

Son yıllarda yapılan çalışmalarda pek çok primer ve metastatik neoplazmda PTEN geninin bulunduğu 10q23 lokusunu ilgilendiren çeşitli genetik anomali gösterilmiştir. PTEN geninin çeşitli kodonlarında bildirilmiş mutasyonların bazıları Tablo 2.7'de gösterilmiştir. Literatürde bildirilmiş çeşitli neoplazilerdeki PTEN mutasyonlarının derlendiği bir çalışmaya göre, genetik anomalilerin başında *frameshift* ve *missense* mutasyonlar ile homozigot gen kayıpları gelmektedir.⁴⁰

Tablo 2.7. PTEN geninde mutasyonu gösterilmiş bazı kodonlar.⁴⁰

Kodon no.	Özellikleri	Toplam germline mutasyon (n=75)	Toplam somatik mutasyon (n=273)
129	Fosfataz <i>core motif</i>	6 (%8)	3 (%1)
130	Fosfataz <i>core motif</i> ; CpG	11 (%14.7)	20 (%7.3)
157	Tersiyer yapı	4 (%5.3)	0
173	CpG	0	12 (%4)
233	CpG; Tyr-P yeri	6 (%8)	8 (2.9%)
316-323	Poly(A)6; tekrar <i>motifi</i> ; Tyr-P yeri	1 (%1.3)	24 (%9)
332-338	335 CpG; Tyr-P and Ser-P yeri	5 (%7)	11 (%4.0)

PTEN insan kanserlerinde en fazla mutasyonu gösterilen genlerden birisidir. Literatürde pek çok somatik malign neoplazmada bildirilmiştir. PTEN genindeki yada kromozom 10q kolundaki anomalilerinin en sık gösterildiği neoplazmlar glioblastomlar, meme, prostat, endometrium ve tiroid karsinomları ile malign melanomlardır. Bunun dışında, over, baş-boyun bölgesi skuamöz hücreli karsinomları, böbrek, akciğer, mide ve kolorektal karsinomlarda da PTEN mutasyonları bildirilmiştir.⁴⁰⁻⁵¹ Bunların dışında otozomal dominant geçişli bazı herediter neoplazi sendromlarında da PTEN geninde *germline* mutasyonlar saptanmıştır. Bu sendromlardan birisi, gastrointestinal multipl hamartomatöz polipler, yüzde trikolemmoma, oral mukozal papillomlar ve artmış oranda meme ve tiroid kanser insidansı ile karakterize Cowden sendromu,⁵² diğeri ise Bannayan-Zonana sendromudur.⁵³

Tümör süpresör gen kusurları sonucu ortaya çıkan neoplazmlardaki klasik genetik anomali, önce bir allelde daha sonra da karşı allelde mutasyon meydana gelmesidir. İkinci allelin kaybına heterozigosite kaybı (*loss of heterozygosity*) adı verilmektedir ve sıklıkla geniş bir kromozom bölgesini ilgilendiren delesyonlar sonucu görülmektedir. PTEN anomali taşıyan glioblastomların %60-80'inde heterozigosite kaybı gösterilmiştir. Yapılan ilk çalışmalarda PTEN kayıplarının özellikle yüksek dereceli glial tümörlerde ve agresif seyirli ve metastatik çeşitli ileri evre neoplazilerde saptanmış olması^{41,42,44} PTEN'in tam kaybının, neoplazilerin daha çok progresyon süreçlerinde etkili olduğunu düşündürmüştür. PTEN'in MMAC1 olarak da adlandırılmasının bir nedeni budur. Ancak yapılan bir çalışmada PTEN geninin tek bir allelindeki mutasyonun (kısmi kaybın) da neoplastik transformasyonu başlatıcı rolü olabileceğini gösterilmiştir⁵⁴. Nitekim literatürde

erken evre endometrium karsinomlarında %55'lere varan oranlarda PTEN kaybı bildirilmiştir.⁴⁰ Endometrioid tip over karsinomlarında da gösterilmiş olan PTEN mutasyonları,^{45,46} ileri olguların tersine, daha düşük dereceli ve erken evre olgularda, ayrıca endometrium kanserleri için preneoplastik kabul edilen endometrial hiperplazilerde de saptanmıştır.^{47,48} Bu bulgular PTEN kaybının karsinogenez sürecinin sadece progresyon evresinde değil, erken evrelerinde de bulunduğunu ve neoplastik transformasyonu başlatıcı bir rol de oynayabileceğini düşündürmektedir.

Literatürde solid neoplazilerde PTEN mutasyonu hakkında çok sayıda çalışma olmasına karşın non-Hodgkin lenfomalarda konuyla ilgili bildirimler daha azdır. Yapılan çalışmalarda NHL'lerde de PTEN genini ilgilendiren genetik lezyonlar saptanmış ve NHL patogenez ve progresyonunda PTEN gen kusurlarının da rol oynadığı gösterilmiştir.⁵⁵⁻⁵⁹

2.3.2. Bcl-2

Bcl-2 18q21 lokusunda bulunan bir onkogendir. Non-Hodgkin lenfomalarda t(14;18) translokasyon sonucu görülen bcl-2 gen reanjmanı ilk kez follikül merkez hücreli B lenfomalarda tespit edilmiştir ve folliküler lenfomalar için karakteristik bir genetik anomali olarak kabul edilmektedir.⁶⁰⁻⁶² Gen ürünü olan bcl-2 molekülü bir apoptozis inhibitörüdür. Bcl-2 ekspresyonu germinal merkez öncesi ve sonrası evrelerdeki B lenfositlerde mevcut iken, germinal merkez reaksiyonlarına katılan lenfositlerde azalmaktadır. Germinal merkezler, lenfoid organlarda matür B hücrelerinin plazma hücresi veya *memory* B hücresi olmak için immünolojik olarak işlendiği ve seçildiği bölgelerdir. Buradaki reaksiyonlar sırasında terminal diferansiyasyon için seçilemeyen pek çok lenfoid hücre apoptozise uğramak zorundadır; bu yüzden bu aşamadaki lenfoid hücrelerde bcl-2 ekspresyonu yoktur, çünkü apoptotik hücre ölümünün olması gereken süreçlerde bcl-2 ekspresyonu durmaktadır.⁶³

Bu translokasyon ile 18q2 lokusundaki bcl-2 proto-onkogeni 14q32 lokusundaki IgH geni yanına yerleşerek (juktapozisyon) aberan bcl-2 ekspresyonu ve buna bağlı aşırı bcl-2 molekülü sentezi meydana gelmektedir. Bcl-2 molekülü ise apoptotik süreci engelleyerek t(14;18) translokasyonu taşıyan hücrelerde kontrolsüz çoğalma ve immortalizasyona neden olarak neoplastik transformasyonda rol oynar.

Germinal merkez B hücrelerinden bu mekanizma ile folliküler lenfomalar meydana gelmektedir.⁶⁴

Bcl-2 ekspresyonu germinal merkez hücreleri için spesifik değildir ve folliküler lenfomalar dışında, DBBHL'lerde de gösterilmiştir.⁶⁵⁻⁶⁸ DBBHL'lerde bcl-2 ekspresyonu %80'lere kadar çıkan oranlarda tespit edilmiştir.⁶⁹ Bcl-2 ekspresyonunun bu spesifik translokasyon dışında, kromozom ve gen amplifikasyonları gibi başka mekanizmalar sonucunda da meydana geldiği bilinmektedir.⁷⁰⁻⁷²

Literatürde bcl-2 eksprese eden DBBHL olgularının daha kötü seyrettiği, özellikle hastaliksız sağkalımı olumsuz etkilediği bildirilmiştir.⁷³⁻⁷⁸ Yüksek miktarlarda üretilen bcl-2 molekülü, antiapoptotik etkisi nedeniyle pek çok kemoterapötik ajanın apoptozis indükleyici mekanizmalar üzerinden gösterdikleri etkilerini de antagonize etmektedir. Bu şekilde meydana getirdiği ilaç direncinden dolayı bcl-2 ekspresyonu, akut lösemi gibi bazı lenfoproliferatif hastalıklarda kötü prognostik bir parametre olarak kabul edilmektedir.^{79,80}

2.3.3. CD20

CD20 sadece B hücrelerinin yüzeyinde bulunan bir proteindir. Transmembran kalsiyum geçişi üzerindeki doğrudan etkileriyle B hücrelerinin aktivasyon ve proliferasyonunu düzenlediği düşünülmektedir.⁸¹ Parafinize dokularda iyi çalıştığından, immünohistokimyasal yöntemlerle güvenilir bir B hücre belirleyicisi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.⁸²

2.3.4. CD30

İlk kez 80'li yılların sonlarında Hodgkin Lenfomaların neoplastik hücre popülasyonunu meydana getiren Reed-Sternberg hücrelerinde gösterilmiş bir antijendir.⁸³ CD30 (Ki-1), T ve B hücrelerinin neoplastik süreçler (Hodgkin veya non-Hodgkin lenfomalar) veya infeksiyöz ajanlar etkisi sonucu aktivasyonu ile ilişkili bir moleküldür. Periferik B ve T hücrelerinde ve monositlerde ekspresyonu gösterilmemiştir. Normal lenf nodunda lenfoid folliküllerin çevresinde dağınık halde CD30⁺ T ve B hücreleri bulunabilmektedir. Yine normal lenf nodunda germinal merkezlerin hemen kenarında CD30⁺ büyük B hücreleri görülebilmektedir. Doku makrofajlarının da granülomatöz iltihabi reaksiyonlar gibi reaktif durumlarda CD30 eksprese ettikleri gösterilmiştir. Non-Hodgkin lenfomalarda yapılan çalışmalarda

karakteristik olarak anaplastik büyük hücreli lenfomaların CD30 ile pozitif immünreaksiyon verdiği bilinmektedir.^{20,84} Bunun dışında diğer B hücreli NHL'lerin yaklaşık %15-20'sinde, T hücreli NHL'lerin de %30'unda CD30 varlığı gösterilmiştir.

2.3.5. EMA

Benign veya malign hemen hemen bütün epitelyal hücrelerde bulunan epitelyal membran antijen sadece epitelyal dokulara spesifik olmayıp, bazı mezenkimal, nöroektodermal ve lenfoid neoplazmlarda da eksprese olabilmektedir. Non-Hodgkin lenfomalar içerisinde karakteristik olarak CD30⁺ (Ki-1) büyük hücreli lenfomalarda sık olarak görülmektedir.⁸⁵

2.3.6. Ki-67

Çeşitli malign neoplazmlarda prognostik belirleyici olarak kullanılan Ki-67, hücre siklusunda G₀ fazı dışındaki fazlarda (geç dönem G₁, S, G₂ ve M fazları) eksprese olmaktadır.^{82,86} Hücre nükleusunda lokalize ve kompleks bir yapıya sahip bu molekülün işlevi henüz tam olarak bilinmemektedir. DNA ve RNA ile karmaşık etkileşimlerinden dolayı hücre proliferasyonu sürecinde kritik rol oynadığı düşünülmektedir.⁸⁷ Ki-67, immünhistokimyasal olarak lenfoid organlarda germinal merkez hücreleri gibi non-neoplastik hücrelerin dağılımını, bir başka deyişle lenfoid folliküllerin normal yapısını göstermede, Burkitt lenfoma gibi bazı non-Hodgkin lenfomaların yüksek derecesini saptamada ve düşük dereceli bir lenfomanın yüksek dereceli bir lenfomaya transformasyonunu belirlemede yardımcı bir tanısal araç olarak kullanılmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgular ve Doku Örnekleri

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında 1999-2002 yılları arasında diffüz büyük B hücreli lenfoma tanısı alan hastaların H&E preparatları tekrar incelenmiştir. Toplam 102 olgu bu araştırmaya dahil edilmiştir (Bkz. EK 2). Olgulara ait klinik bilgiler biyopsi istek formlarından ve hastaların dosyalarından elde edilmiştir. Preparatlar ışık mikroskopu altında iki ayrı patolog tarafından tekrar değerlendirilmiş ve WHO Sınıflamasına göre morfolojik tiplerine ayrıldıktan sonra immünohistokimyasal çalışmalar uygulanmıştır.

3.2. İmmünohistokimya

İmmünohistokimyasal çalışmalar %10'luk formalin ile fikse edilmiş dokuların parafin bloklarından hazırlanan 5µm kalınlığındaki kesitlere uygulanmıştır. Tüm olgularda antijen açığa çıkarma işlemi yapılmış ve avidin-biotin-peroksidaz yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan primer antikolar Tablo 3.1'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. İmmünohistokimyasal çalışmalarda kullanılan primer antikolar.

Primer antikor	Klon, Tip	Dilüsyon	İnkübasyon (dakika)	Firma
CD20	Monoklonal, <i>mouse</i>	1/100	30	NeoMarkers, ABD
CD30	Monoklonal, <i>mouse</i>	1/20	30	DAKO, Danimarka
EMA	Monoklonal, <i>mouse</i>	1/2000	30	NeoMarkers, ABD
Ki-67	Monoklonal, <i>mouse</i>	1/100	30	NeoMarkers, ABD
Bcl-2	Monoklonal, <i>mouse</i>	1/40	30	DAKO, Danimarka
PTEN	Monoklonal, <i>mouse</i>	1/200	30	Novocastra, İngiltere

İmmünohistokimyasal boyama işlemlerinde aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir.

1. Kesitler etüvde 57 °C'de 16 saat tutularak deparafinize edildi.
2. Ksilolde 15 dakika bekletilerek deparafizasyona devam edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı.

3. %95'lik etanolde 15 dakika tutularak dehidrate edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı.
4. Çeşme suyunda 5 dakika yıkandı.
5. Parafin kesitler %0,5'lik hidrojen peroksit içeren %80'lik metanol ile kaplanıp 10 dakika inkübe edilerek endojen peroksidaz aktivitesi inhibe edildi.
6. Preparatlar 0,01M tri-sodyum sitrat solüsyonu ile doldurulmuş kaplara konduktan sonra mikrodalga fırında 700W güçte 15 dakika ısıtıldı.
7. Mikrodalga işleminden sonra kesitler oda sıcaklığında 15 dakika soğumaya bırakıldı, daha sonra PBS (*phosphate buffer saline*) solüsyonuyla 5 dakika yıkandı.
8. Dokular primer antikorlarla oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
9. PBS solüsyonuyla 5 dakika yıkandı.
10. Biotin ile işaretli bağlayıcı sekonder antikor ile 10 dakika inkübe edildi.
11. PBS ile 5 dakika yıkandı.
12. Streptavidin-konjüge peroksidaz ile 10 dakika inkübe edildi.
13. PBS solüsyonuyla 5 dakika yıkandı.
14. Kromojen solüsyonundaki 3,3'diaminobenzidin ile 10 dakika boyandı.
15. Çeşme suyunda 5 dakika yıkandı.
16. Kesitler hematoksilende 10 saniye tutularak nükleer boyama gerçekleştirildi.
17. Çeşme suyunda 3 dakika yıkandı.
18. Alkolde 15 dakika tutularak dehidrate edildi, ksilolde şeffaflandırılarak balsam ile kapatıldı.

3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

İmmünohistokimyasal sonuçların değerlendirilmesinde CD20, CD30 ve EMA ile membranöz, bcl-2 ile sitoplazmik, Ki-67 ve PTEN ile nükleer boyanmalar pozitif kabul edilmiştir. PTEN immünoekspresyonunun değerlendirilmesinde, dokulardaki non-neoplastik lenfositler ve normal çevre dokuya ait hücrelerdeki (epitel, damar endoteli) nükleer boyanmalar iç kontrol olarak kullanılmıştır. Buna göre PTEN ile immün boyanma kontrol hücrelerinkileriyle benzer şiddette olduğunda, neoplazmda PTEN kaybı olmadığı, PTEN immünpozitivitesi kontrol hücrelerinkine göre daha zayıf şiddette olduğunda yada neoplastik hücre nükleuslarında PTEN ile hiç immün boyanma görülmediğinde, neoplazmda PTEN kaybı olduğu kabul edilmiştir.

3.4. İstatiksel Analiz

Bütün veriler *Microsoft Access 2000* veritabanına girilmiştir. Burada derlenen veriler istatistiksel inceleme amacıyla *Statistical Package for Social Sciences (SPSS) v 10.0 for Windows* programına aktarılmıştır. Nitelik değişkenler (histomorfolojik tip, immünohistokimyasal belirleyicilerin pozitiflikleri, lokalizasyon) arasındaki fark Pearson χ^2 testi ile değerlendirilmiştir. Bağımsız değişkenlerin sağkalım üzerindeki etkileri Kaplan-Meier testi ile araştırılmıştır. Tüm testlerde p değerinin 0,05'in altında ($p < 0,05$) olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



BULGULAR

4.1. Olguların Klinik Özellikleri

Diffüz büyük B hücreli lenfoma tanısı alan 102 olgunun 51'i (%50) erkek, 51'i (%50) kadındır. En genç hasta 11, en yaşlı hasta 101 yaşındadır. Ortalama yaş 52,6'dır. 102 hastanın yalnızca 79'unun (%77,5) takip bilgilerine ulaşılabilmektedir. Hastaların ortalama takip süreleri 1 ay ile 42 ay arasında değişmektedir (ortalama 15,4 ay). Takibi olan 79 hastanın 25'i (%31,6) ölmüştür. Hayatta kalan hasta sayısı 54'tür (% 68,4). Lenfomalar 49 (%48) olguda nodal, 53 (%53) olguda ektranodal yerleşimlidir. Çalışma grubumuzdaki olguların lokalizasyon dağılımında dikkat çekici bir nokta, ektranodal yerleşimli lenfoma olgularının daha yüksek oranda olmasıdır. Gastrointestinal sistem 16 olgu ile ektranodal lokalizasyonlar içinde ilk sırada gelmektedir. Bu olguların 8'i mide yerleşimlidir. 5 olgu kadın genital organlarında, 5 olgu timusta, 3 olgu dalakta, geri kalan 24 olgu ise kemik, akciğer, meme, böbrek, beyin gibi çeşitli organlarda lokalizedir. Olgulara ait bazı klinik özellikler Tablo 4.1'de özetlenmiştir.

Tablo 4.1. Olguların bazı klinik özellikleri.

<u>Yaş</u>	
En küçük	11
En büyük	101
Ortalama	52,6
<u>Cinsiyet</u>	
Kadın	51
Erkek	51
<u>Lokalizasyon</u>	
Nodal	49
Ektranodal	53
<u>Takip süresi (ay)</u>	
En kısa	1
En uzun	42
Ortalama	15,4
<u>Sağkalım</u>	
Eksitus	25
Sağ	54
Bilinmeyen	23

102 hastanın biyopsi örneklerini temsil eden preparatlar ışık mikroskopunda tekrar incelenmiş ve olgular WHO Sınıflamasına göre histomorfolojik tiplerine ayrılmıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Olguların WHO Sınıflamasına göre histomorfolojik olarak dağılımı.

Histomorfolojik tip	Olgu Sayısı	%
Sentroblastik	71	69,6
Anaplastik	15	14,7
İmmünoblastik	3	2,9
Burkitt benzeri	8	7,8
T hücreden zengin	5	4,9
Toplam	102	100

4.2. Morfolojik Tiplerin Lokalizasyon, İmmünofenotipik ve Sağkalım Özellikleri

Sentroblastik Tip: Veziküle nükleuslu, nükleer membrana yapışık nükleollere sahip lenfositlerden oluşan neoplazmlar sentroblastik tip olarak sınıflandırılmıştır (Resim 4.1A). Buna göre 71 (%69,6) olgu bu grupta yer almıştır. Sentroblastik lenfomaların 32'si (%45,1) nodal, 39'u (%54,9) ektranodal yerleşimlidir. Hasta takip bilgisi mevcut olan 53 olgunun 17'si (%32,1) ölmüştür. 36 (%67,9) olgu hayattadır; bunların 24'ünde hastalık devam etmekteyken, 12'sinde tam remisyona elde edilmiştir. Bu gruptaki lenfomaların immünofenotipik özelliklerine bakıldığında, CD30 ile 8'i pozitif, 62'si negatif; EMA ile 10'u pozitif, 61'i negatif; bcl-2 ile 43'ü (%62,3) pozitif, 26'sı (%37,7) negatiftir. Ki-67 indeksi 12 olguda %90'ın üzerindedir. PTEN kaybı 19 olguda (%26,7) mevcut iken 52 olguda saptanmamıştır (Tablo 4.3). Sentroblastik lenfomalar ile lokalizasyon, immünofenotipik özellikler ve sağkalım arasında bir korelasyon saptanmamıştır.

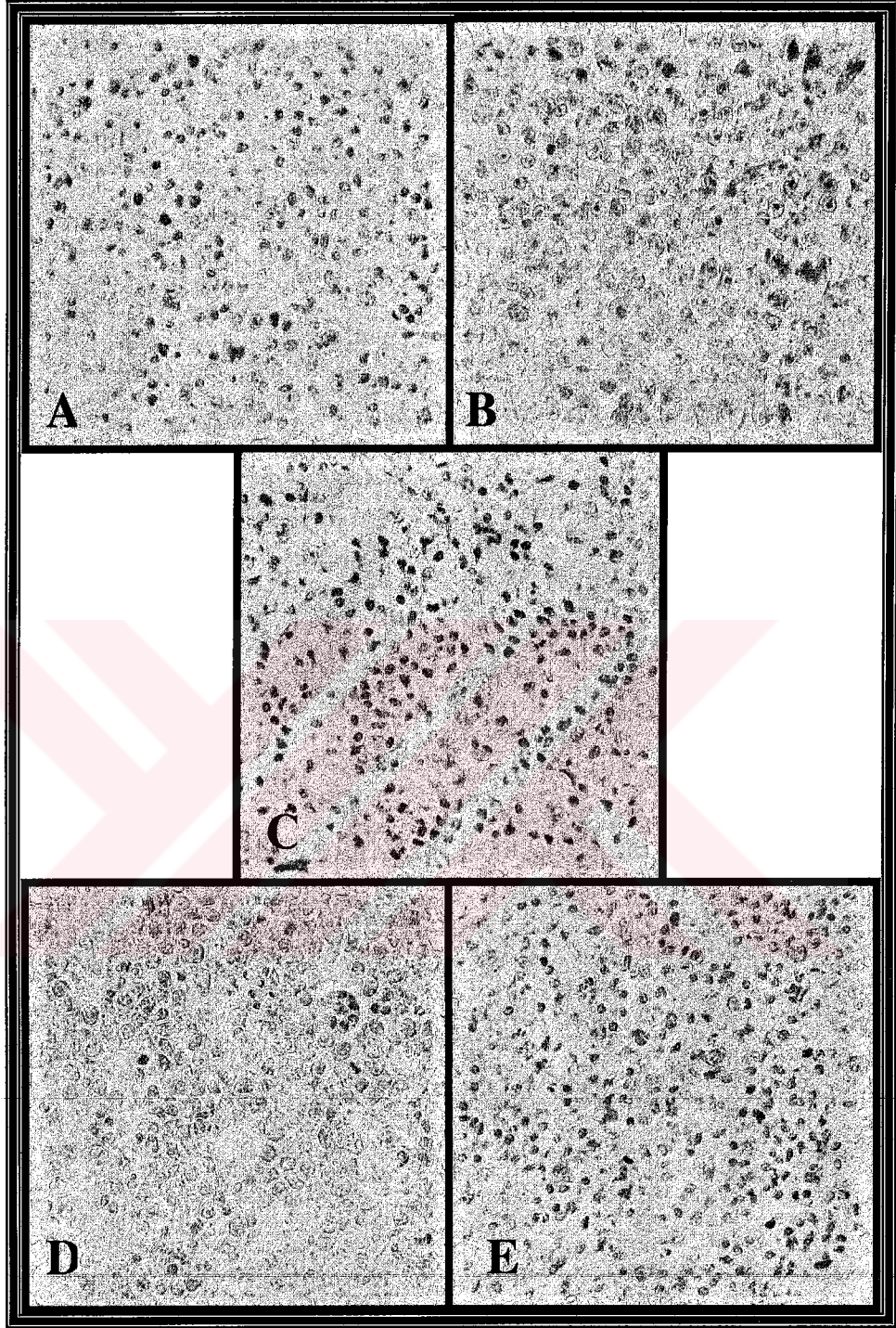
İmmünoblastik Tip: İmmünoblastlar sentroblastlara göre biraz daha iri nükleuslu ve santral yerleşimli tek nükleollere sahip hücrelerdir (Resim 4.1B). Neoplazm içerisindeki immünoblastların oranının %90'ın üzerinde olduğu olgular immünoblastik tip olarak kategorize edilmiştir. Buna göre 3 olgu bu grupta yer almıştır. Olguların ancak birisinin takip bilgisine ulaşılabilmektedir ve bu olgu hayattadır. Olguların lokalizasyonları ve immünohistokimyasal bulguları EK 1 ve

Tablo 4.3'te gösterilmiştir. CD30 ve EMA ile olguların hiçbirinde immünreaksiyon elde edilmezken, bcl-2 ekspresyonu üç olguda da mevcuttur. PTEN kaybı 1 olguda (%33,3) saptanmıştır. İmmünoblastik lenfoma olgularının sayısı çok az olduğundan lokalizasyon, immünfenotip ve sağkalım arasında korelasyon saptanmamıştır.

Anaplastik Tip: Konturları düzensiz, polilobe ve pleomorfik görünümde hücrelerden oluşan lenfomalar anaplastik lenfoma olarak gruplandırılmıştır. Bu grupta 15 olgu mevcut olup, 7'si nodal, 8'i ektranodal yerleşimlidir. Takip bilgileri elde edilebilen 13 anaplastik lenfoma olgusunun 11'i (%84,6) hayattadır; bu olguların 2'sinde tam remisyon mevcut olup 9'unda hastalık devam etmektedir. İmmünohistokimyasal olarak 9 (%60) olgu CD30, 7 (%46,7) olgu EMA ile pozitif reaksiyon vermiştir. Olguların 12'sinde (%80) bcl-2 ekspresyonu saptanmıştır. Olguların %15,4'ünde yüksek Ki-67 proliferasyon indeksi görülmüştür. PTEN kaybı 15 olgunun 8'inde (%53,3) mevcuttur. Anaplastik lenfomaların sağkalım üzerine anlamlı bir etkisi saptanmamıştır.

T Hücreden Zengin Tip: Zeminde bol miktarda reaktif T hücresi bulunan olgular T hücresinden zengin tip olarak sınıflandırılmıştır. Bu grupta 5 olgu yer almaktadır. 5 olgunun 4'ü lenf nodlarında lokalizedir. Olguların 2'si hayatta olup 3'ü ölmüştür. CD30 4 olguda değerlendirilebilmiş olup 3 (%75) olgu pozitifdir. EMA 2 (%40) olguda, bcl-2 ise 3 (%60) olguda pozitif reaksiyon vermiştir. Olguların tümünde Ki-67 proliferasyon indeksi %90'ın altındadır. PTEN ekspresyon kaybı 3 (%60) olguda mevcuttur. Bu grup olgu sayısının da az olması nedeniyle lokalizasyon, diğer immün belirleyiciler ve sağkalım arasında ilişki saptanmamıştır.

Burkitt Benzeri Tip: Histolojik derecesi yüksek, mitoz ve *tingible body* makrofajlardan zengin, hücre morfolojisi ve gelişim paterni Burkitt lenfomaya benzeyen olgular Burkitt benzeri DBBHL olarak sınıflandırılmıştır. 8 olgu bu grupta yer almaktadır. 5 (%62,5) olgu nodal yerleşimlidir. Takip bilgilerine ulaşılabilen 7 olgunun 4'ü (%57,1) hayatta olup 3'ü (%42,9) ölmüştür. İmmünohistokimyasal olarak olguların tümü CD30 ve EMA ile negatif reaksiyon vermiştir. Bcl-2 3 (%37,5) olguda pozitifdir. 8 olgunun 6'sında (%75) Ki-67 proliferasyon indeksi >%90'dır. 4 (%50) olguda PTEN kaybı mevcuttur. Yüksek dereceli olan bu lenfomaların muhtemelen olgu sayısının az olması nedeniyle sağkalım üzerine bir etkisi saptanmamıştır.



Resim 4.1. Olguların WHO Sınıflamasına göre histomorfolojik tipleri. A) Sentroblastik tip, B) İmmünoblastik tip, C) Anaplastik tip, D) Burkitt benzeri tip, E) T hücreden zengin tip (H&E, x400).

4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

Olguların immünohistokimyasal özellikleri ve DBBHL morfolojik tipleri ile karşılaştırılması Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. DBBHL histomorfolojik tiplerine göre immünohistokimyasal bulgular.

	İmmünohistokimyasal Belirleyici											
	CD20		CD30		EMA		BCL-2		Ki-67 (%)		PTEN (kayıp)	
	+	-	+	-	+	-	+	-	>90	<90	E	H
Sb n=71	71	0	8	62	10	61	43	26	12	40	19	52
Ana n=15	15	0	9	6	7	8	12	3	1	12	8	7
İb n=3	3	0	0	3	0	3	3	0	0	2	1	2
Bur n=8	8	0	0	8	0	7	3	5	6	2	4	4
THZ n=5	5	0	3	1	2	3	3	2	0	5	3	2
Toplam	102	0	20	80	19	82	64	36	19	61	35	67

Sb: Sentroblastik, Ana: Anaplastik, İb: İmmünoblastik, Bur: Burkitt benzeri, THZ: T hücreden zengin, E: Evet, H: Hayır, n: Olgu sayısı

CD20: CD20 ile 102 olgunun tamamında pozitif membranöz reaksiyon saptanmıştır.

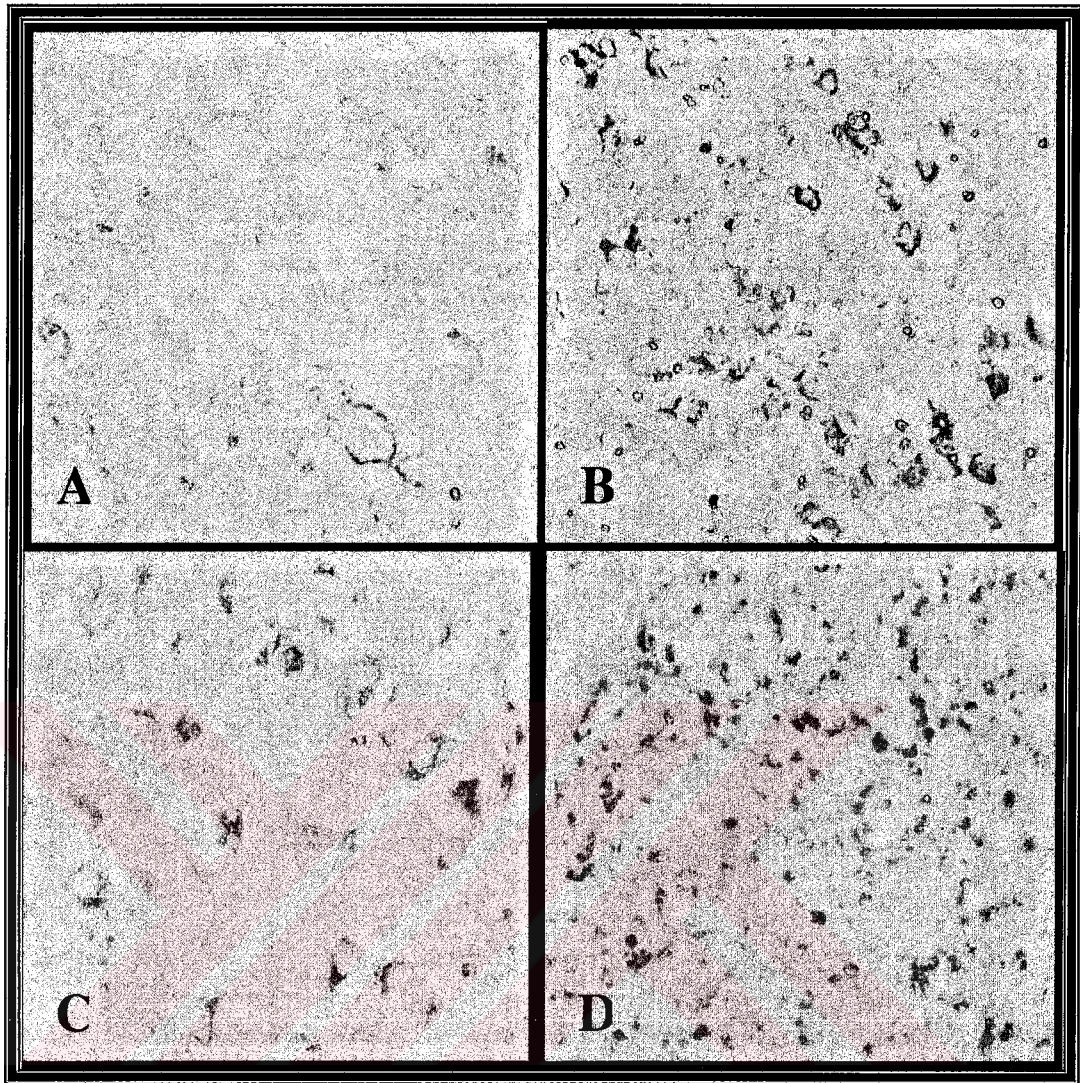
CD30: CD30 100 olguda değerlendirilebilmiştir. 100 olgunun 18'inde kuvvetli ve diffüz, 2'sinde fokal, toplam 20 (%20) olguda membranöz reaksiyon gözlenmiştir (Resim 4.2A). 80 olguda (%80) immünreaksiyon saptanmamıştır. Pozitif reaksiyon izlenen olguların 9'u (%45) anaplastik, 8'i (%40) sentroblastik, 3'ü T hücreden zengin tip lenfomadır. İmmünoblastik ve Burkitt benzeri olgularda CD30 reaksiyonu saptanmamıştır. Morfolojik tipler arasında CD30 immünekspressyonu açısından bir korelasyon saptanmamıştır. CD30 pozitif lenfomaların 10'u (%50)

nodal, 10'u (%50) ektranodal yerleşimlidir ve lokalizasyonları arasında da bir korelasyon mevcut değildir.

EMA: EMA 101 olguda değerlendirilebilmiştir. 11'inde diffüz, 8'sinde fokal olmak üzere 19 (%18,8) olguda pozitif, 82 (%81,2) olguda negatif reaksiyon görülmüştür (Resim 4.2B). EMA pozitif olguların 10'u (%52,6) sentroblastik, 7'si (%36,8) anaplastik, 2'si (%10,5) ise T hücreden zengin tip lenfomadır. Morfolojik tipler içinde EMA immünpozitivitesi en yüksek oranda anaplastik lenfomalarda saptanmıştır (%46,7). İmmünoblastik ve Burkitt benzeri tiplerde EMA pozitivitesi saptanmamıştır. EMA pozitif toplam 19 olgunun 16'sının (%84,2) aynı zamanda bcl-2 de eksprese ettiği görülmüştür ve bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($\chi^2=4.301$, $p=0.038$). EMA pozitif olguların 12'si (%63,2) nodal 7'si (%36,8) ektranodal yerleşimlidir ancak lokalizasyonlar arasında korelasyon mevcut değildir.

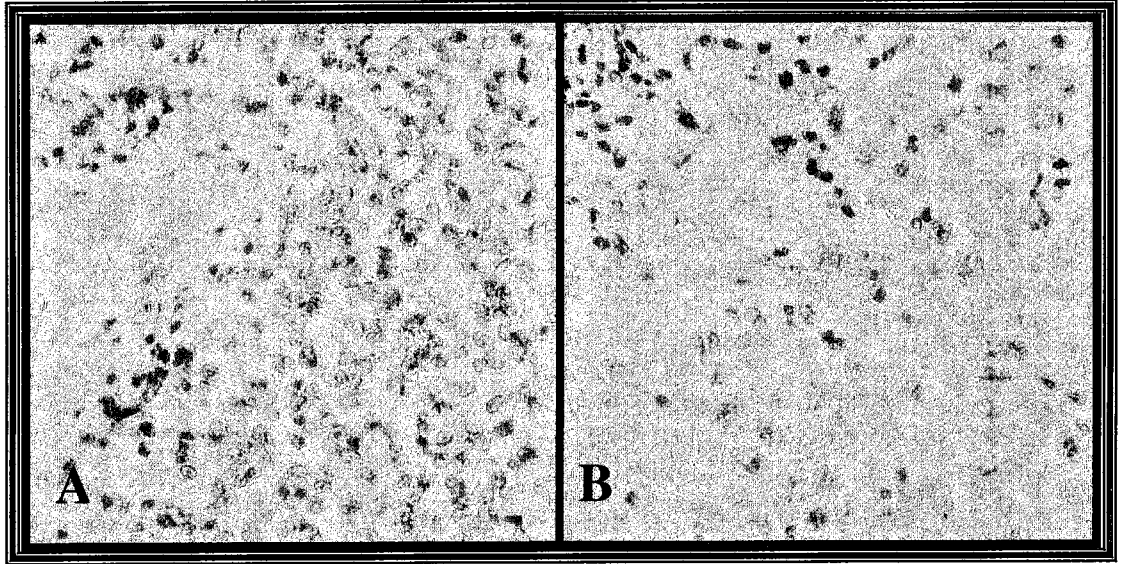
Ki-67: Bir proliferasyon indeksi belirleyicisi olan Ki-67 ile 102 olgunun 80'i değerlendirilebilmiştir. Ki-67 proliferasyon indeksi 80 olgunun 19'unda (%23,8) %90 ve üzerinde, 61'inde ise (%76,2) %90'ın altında bulunmuştur. Burkitt benzeri toplam 8 olgunun 6'sında (%75) bu oran % 100'e yakındır (Resim 4.2C). Yüksek Ki-67 pozitivitesi ile sağkalım arasında, muhtemelen bu grup olgu sayısının az olması nedeniyle korelasyon saptanmamıştır.

Bcl-2: Toplam 100 olguya ait bcl-2 immünhistokimya sonucu değerlendirilmeye alınmıştır. Bunların 7'sinde fokal olmak üzere 64'ünde (%64) pozitif, 36'sında (%36) negatif immünreaksiyon gözlenmiştir (Resim 4.2D). Sentroblastik lenfomaların 43'ünde (%62,3), anaplastik lenfomaların 12'sinde (%80), immünoblastik lenfomaların 3'ünde (%100), Burkitt benzeri lenfomaların 3'ünde (%37,5), ve T hücreden zengin lenfomaların 3'ünde (%60) bcl-2 pozitivitesi saptanmıştır ancak aralarında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Bcl-2 ekspresyonu ile lenfomaların lokalizasyonu karşılaştırıldığında bcl-2 pozitif olguların 37'sinin (%57,8) nodal, 27'sinin (%42,2) ektranodal yerleşimli olduğu görülmüştür. Nodal yerleşimli 49 olgunun 37'sinde (%75,5), ektranodal yerleşimli 51 olgunun 27'sinde (%52,9) bcl-2 pozitif saptanmıştır ve bu bulgu istatistiksel olarak anlamlıdır ($\chi^2=5,525$, $p=0.019$).



Resim 4.2. Bazı olgularda CD30, EMA, Ki-67 ve bcl-2 immünekspresyonu. Anaplastik lenfoma olgularında CD30 (A), EMA (B) ve bcl-2 (C) pozitivitesi. D) Arada *tingible-body* makrofajların eşlik ettiği Burkitt benzeri bir lenfoma olgusunda yaygın Ki-67 pozitivitesi.

PTEN: PTEN'e ait ekspresyon kaybı, immünohistokimyasal olarak neoplastik hücrelerde nükleer boyanma şiddetinde azalma yada tam kayıp olmasıyla değerlendirilmiştir. Toplam 102 olgunun 67'sinde (%65,7) PTEN ile boyanma korunmuş iken, 35 olguda (%34,3) immünohistokimyasal olarak PTEN ekspresyon kaybı saptanmıştır (Resim 4.3). PTEN kaybı olan 35 olgunun 19'u (%54,3) sentroblastik, 8'i (%22,8) anaplastik, 1'i (%2,8) immünoblastik, 4'ü (%11,4) Burkitt benzeri, 2'si (%5,7) ise T hücreden zengin tip lenfomadır (Tablo 4.4).



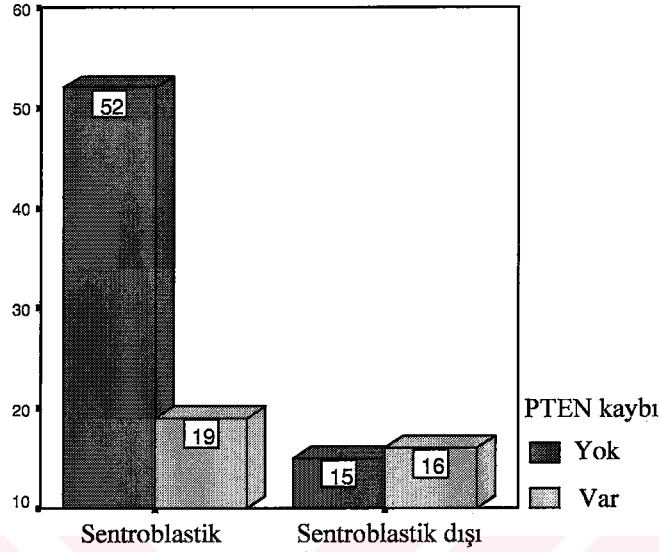
Resim 4.3. PTEN immünoekspresyonu. A) PTEN ekspresyonu korunmuş bir DBBHL olgusunda neoplastik hücrelerde nükleer PTEN immünreaktivitesi. Damar endoteli ve duvarındaki normal hücrelerde de aynı şiddette nükleer boyanma mevcuttur. B) PTEN ekspresyon kaybı olan bir DBBHL olgusunda neoplastik hücre nükleuslarında boyanma yok iken, aradaki küçük, matür lenfositlerde PTEN ekspresyonu normal olarak korunmuştur.

Tablo 4.4. PTEN ekspresyonunun histomorfolojik tiplere göre dağılımı.

Histomorfolojik tip	PTEN (Kayıp)		Toplam
	Var	Yok	
Sentroblastik	19	52	71
Anaplastik	8	7	15
İmmünoblastik	1	2	3
Burkitt benzeri	4	4	8
T hücreden zengin	3	2	5
Toplam	35	67	102

Olgular sentroblastik ve sentroblastik olmayan tip olarak iki gruba ayrıldığında, PTEN ekspresyon kaybı sentroblastik olmayan grupta daha yüksek oranda bulunmuştur (Şekil 4.1). PTEN ekspresyon kaybı sentroblastik morfolojideki 71 olgunun 19'unda (%26,7), sentroblastik dışı morfolojideki 31 olgunun 16'sında (%51,6) saptanmıştır. Bu oranlar istatistiksel olarak anlamlıdır ($\chi^2=5,913$ p=0,05).

PTEN kaybı olan olguların 19'u (%54,3) nodal, 16'sı (%45,7) ektranodal yerleşimlidir ancak lokalizasyonlar arasında bir korelasyon mevcut değildir.



Şekil 4.1. Sentroblastik ve sentroblastik dışı olgularda PTEN kaybı.

4.4. Sağkalım ile Morfolojik ve İmmünofenotipik Özellikler Arası İlişki

79 olgunun takip bilgilerine ulaşılabilmektedir. Bunların 54'ü (%68,3) hayatta olup 25'i (%31,6) ölmüştür. Ölen olguların 13'ü kadın, 12'si erkektir. Ortalama ölüm yaşı 53,1'dir. Olgular ortalama 10,9 ay içinde hayatlarını kaybetmişlerdir.

Ölen olgulardaki lenfoma tipleri Tablo 4.5'te gösterilmiştir. Bunların 17'si (%68) sentroblastik lenfoma olgusudur. Sentroblastik tipteki 53 olgunun 17'si (%32) anaplastik tipteki 13 olgunun 2'si (%15,4), T hücreden zengin tipteki 5 olgunun 3'ü (%60), ve Burkitt benzeri morfolojideki 7 olgunun 3'ü (%42) ve ölmüştür. Takibi olan immünoblastik tipteki 1 olgu hayattadır.

Ölen olgularda lenfomalar 16 olguda ektranodal, 9 olguda ise nodal yerleşimlidir. Ki-67 ile proliferasyon indeksi 7 olguda %90'ın üzerinde olup bcl-2 pozitivitesi 13 olguda mevcuttur. Morfolojik tiplerin ve lenfoma lokalizasyonlarının sağkalım üzerinde anlamlı bir etkisi saptanmamıştır.

Tablo 4.5. Sağkalım oranlarının histomorfolojik tiplere göre dağılımı.

Histomorfolojik tip	Sağkalım		Toplam
	Eksitus	Sağ	
Sentroblastik	17	36	53
Anaplastik	2	11	13
İmmünoblastik	0	1	1
Burkitt benzeri	3	4	7
T hücreden zengin	3	2	5
Toplam	25	54	79

4.4.1. Sağkalım ve bcl-2 ekspresyonu

Takip bilgilerine ulaşılan 79 olgunun 77'sinde bcl-2 ekspresyonu immünohistokimyasal olarak değerlendirilebilmiştir (Tablo 4.6). 77 olgunun 24'ü (%31,1) ölmüştür. Ölen 24 olgunun 13'ünde (%54,1), hayatta kalan 53 olgunun 36'sında (%67,9) bcl-2 pozitifitesi mevcuttur. Bunların 10'unda tam remisyona elde edilmiş olup 26 olguda hastalık devam etmektedir. Sağkalım ve bcl-2 ekspresyonu arasında bir korelasyon saptanmamıştır.

Tablo 4.6. Sağkalım ve bcl-2 ekspresyonu.

		Sağkalım		Toplam
		Eksitus	Sağ	
Bcl-2	+	13	36	49
	-	11	17	28
Toplam		24	53	77

4.4.2. Sağkalım ve PTEN ekspresyonu

Takip bilgileri elde edilebilen 79 olguya ait olguların PTEN ile immünohistokimyasal çalışma sonuçları Tablo 4.7’de gösterilmiştir. Buna göre 79 olgunun 25’inde (%31,6) PTEN ekspresyon kaybı saptanmıştır. Ölen 25 olgunun 8’inde (%32), hayatta kalan 54 olgunun 17’sinde (% 31.5) PTEN kaybı mevcuttur ve oranlar hemen hemen aynıdır. Hayatta kalan 17 olgunun 11’inde hastalık devam etmekte olup 6 olguda tam remisyon görülmüştür. PTEN ekspresyonu ve sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Tablo 4.7. Sağkalım ve PTEN ekspresyonu

		Sağkalım		Toplam
		Eksitus	Sağ	
PTEN (Kayıp)	Var	8	17	25
	Yok	17	37	54
Toplam		25	54	79

TARTIŞMA

İlk lenfoma sınıflamaları esas olarak neoplazmın histomorfolojik özelliklerine göre yapılmış, daha sonraki sınıflamalar ise klinisyenlere tedavi açısından daha yol gösterici olacak şekilde hastalığın biyolojik davranışlarını da içerecek şekilde yenilenmiş ve güncelleştirilmiştir. Son yıllarda immünoloji ve özellikle moleküler genetik alanındaki ilerlemeler sonucunda lenfomaların morfolojik ve klinik özelliklerine ek olarak, köken aldıkları hücreleri ve taşıdıkları moleküler genetik anomalileri de saptamak mümkün olmuştur. Tüm bu bilgiler en son WHO tarafından derlenerek lenfomalar kendilerine özgü histomorfolojik, immünofenotipik ve genetik özelliklerine göre ayrı birer antite olarak sınıflandırılmış^{9,10} ve bu yeni listeye önceki sınıflamalarda mevcut olmayan yeni tanımlanan lenfoma tipleri eklenmiştir.

Diffüz büyük B hücreli lenfomalar WHO lenfoma sınıflaması içerisindeki en büyük grubu oluşturmaktadır ve tüm non-Hodgkin lenfomaların üçtebirinden fazlasını meydana getirmektedir. DBBHL, büyük neoplastik B hücrelerinden meydana gelen çeşitli lenfoma tiplerinin birarada sınıflandırıldığı heterojen bir lenfoma grubudur. Bu grubun içerisinde histomorfolojik özellikleri birbirinden farklı çeşitli lenfomalar yer almaktadır (Tablo 2.7). DBBHL *intermediate* dereceli lenfoma olarak kabul edildiğinden ve benzer kemoterapi protokolü (CHOP: siklofosfamid, doksorubisin, vinkristin, prednizolon) uygulandığından ortak bir başlık altında toplanmış olmakla birlikte bazı tipleri çok agresif seyir göstermektedir. Bunlar içinde immünoblastik ve Burkitt benzeri lenfomaların en agresif seyir izleyen DBBHL tipleri olduğu kabul edilmektedir.¹⁵⁻¹⁷ DBBHL sadece histomorfolojik ve klinik olarak değil, moleküler genetik anomaliler ve *microarray* ile gen ekspresyon profilleri açısından da heterojenite gösteren lenfomalardan oluşmaktadır. *Microarray* sonuçlarına göre DBBHL'ler, germinal merkez B hücresi orijinli lenfomalar ve aktive B hücresi orijinli lenfomalar olmak üzere iki farklı gen ekspresyonu profili gösteren lenfoma tiplerinden oluşmaktadır¹⁴. Buna göre histolojik olarak sentroblastik lenfomaların özellikle birinci grupta, sentroblastik polimorfik ve immünoblastik lenfomaların ikinci grupta yer aldığı görülmüş ve germinal merkez B hücre orijinli lenfomaların biyolojik seyirlerinin de daha iyi olduğu gösterilmiştir.^{73,88}

Non-Hodgkin lenfomalarında gösterilen genetik anomalilerin başında özellikle kromozom translokasyonları ve buna bağlı onkogen aktivasyonları gelmektedir. Sık görülen translokasyonlardan bazıları Tablo 2.2’de gösterilmiştir. Karsinogenezden sorumlu bir diğer önemli genetik mekanizma ise tümör süpresör gen mutasyonlarıdır. Tümör süpresör genlerin malign lenfoma patogenezindeki rolleri onkogenlere oranla çok daha az araştırılmış bir konudur. Lenfoid neoplazilerin bir kısmında p16 ve p53 gibi tümör süpresör gen mutasyonları tespit edilmiştir.^{89,90} Son yıllarda tanımlanmış yeni bir tümör süpresör gen olan PTEN’i ilgilendiren mutasyonlar pek çok malign solid neoplazmada gösterilmiştir. Ancak, literatür bilgilerimize göre malign lenfomalardaki PTEN anomalilerine yönelik çalışma oldukça az sayıdadır.

Non-Hodgkin lenfomalarda sık görülen kromozom translokasyonlarından olan t(14;18) translokasyonu folliküler lenfomalar için karakteristiktir ve DBBHL’lerin de bir kısmında gösterilmiştir.⁶⁷ Bu translokasyon sonucunda 18q21’deki bcl-2 proto-onkogeni 14q32’deki IgH geni yanına yerleşerek bcl-2 gen ekspresyonunun deregülasyonuna ve bcl-2 protein seviyelerinin artmasına neden olmaktadır. Bcl-2 proteini ise apoptotik süreci engelleyerek t(14;18) translokasyonu taşıyan hücrelerde kontrolsüz çoğalma ve immortalizasyona neden olarak neoplastik transformasyona neden olur.

Bcl-2 immünpozitivitesi olgularımızın 64’ünde (%64) saptanmıştır. Literatürde DBBHL’lerde değişik oranlarda bcl-2 ekspresyonu bildirilmiştir. Bu oran bazı araştırmalarda %80’lere kadar çıkmaktadır⁶⁹. Bcl-2 immünpozitif 64 olgumuzun 43’ü (%67,2) sentroblastik, 21’i (%32,8) sentroblastik dışı lenfomadır. Bcl-2 ekspresyonu, folliküler lenfoma gibi germinal merkez hücre kökenli lenfomalarda olduğu gibi sentroblastik lenfomalarda da beklenebilir. Ancak olgularımızda sentroblastik ve diğer lenfoma grupları arasında bcl-2 pozitifliği açısından bir ilişki saptanmamıştır çünkü çalışma grubumuzdaki sentroblastik lenfoma olgularının sayısı da (n=71) bcl-2 pozitivitesine paralel şekilde diğer grubun (n=31) yaklaşık iki katıdır. Çalışmamızda sentroblastik lenfomaların %62,3’ü, sentroblastik tipte olmayan lenfomaların ise %67,7’si bcl-2 pozitifdir ve bu oranlar birbirlerine çok yakındır. Başka çalışmalarda da gösterildiği gibi bcl-2 pozitivitesi tek başına folliküler hücre kökenli bir lenfomanın spesifik bir göstergesi değildir. Bcl-2

ekspresyonunun bazı postgerminal merkez fenotipli lenfomalarda da görülebildiği bildirilmiştir.

Literatürde bcl-2 eksprese eden DBBHL olgularının daha kötü seyrettiği de bildirilmiştir.⁷³⁻⁷⁸ Çalışma grubumuzda agresif DBBHL tipleri olarak kabul edilen immünoblastik tip 3 olgunun tamamının, anaplastik tip 15 olgunun 12'sinin bcl-2 pozitif olması bu bulguyu destekleyebilir. Çalışmamızda takip bilgileri olan 77 olguda bcl-2 ekspresyonu değerlendirilebilmiştir. Bcl-2 pozitif 49 olgunun 13'ü (%26,5) ölmüştür. 36 olguda (%73,5) tam remisyona gözlenmiş olup 26 olguda (%53,1) hastalık devam etmiştir. İstatistiksel olarak olgularımızda bcl-2 ekspresyonunun bağımsız bir faktör olarak sağkalımı etkilemediği görülmüştür, ancak bu durumun olguların bir kısmında yeterli klinik bilgiye ulaşılamamış olmasından kaynaklanması muhtemeldir.

DBBHL lokalizasyonlarına göre bcl-2 ekspresyonuna bakıldığında, bcl-2 pozitif olguların %57,8'inin lenf nodlarında, %42,2'sinin ise ektranodal bir odakta yerleşik olduğu görülmüştür. Nodal yerleşimli 49 olgunun 37'sinde (%75,5), ektranodal yerleşimli 51 olgunun 27'sinde (%51,9) bcl-2 pozitifdir. Bu oranlar istatistiksel olarak da anlamlıdır ($\chi^2=5,525$, $p=0.019$). Literatürde DBBHL lokalizasyonları ile bcl-2 ekspresyonunun karşılaştırıldığı bir çalışmada böyle bir ilişki saptanmamıştır.⁶⁹ Bcl-2 ile EMA pozitivitesi arasında da korelasyon saptanmıştır. EMA pozitif olguların %84,2'si bcl-2 ile de pozitif immünreaksiyon vermiştir ($\chi^2=4.301$, $p=0.038$). Literatür bilgilerimize göre bu iki belirleyici arasında benzer bir ilişki bildirilmemiştir.

İlginç olarak, literatürde t(14;18) translokasyon anomalisi taşıyan lenfomaların %90'ında ikincil kromozomal anomaliler de gösterilmiştir.^{91,92} Siebert ve arkadaşlarının bir çalışmasında t(14;18) translokasyonu taşıyan B hücreli lenfomaların %11'inde, translokasyon anomalisi olmayan olguların ise %1'inden daha azında, üzerinde PTEN geninin de yer aldığı 10q delesyonları saptanmış ve t(14;18) translokasyonlu lenfomaların patogenezinde PTEN'in de dahil olduğu tümör süpresör gen mutasyonlarının rol alabileceği savunulmuştur.⁹³ Olgularımızda bcl-2 ekspresyonu ve PTEN kaybı arasındaki olası bir korelasyon araştırıldığında bcl-2 pozitif 64 olgunun 21'inde (%32,8) PTEN kaybı saptanmış ancak istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır. Ancak bizimki gibi immünohistokimyasal yöntemlere

dayalı bir çalışmada PTEN kaybının 10q delesyonuna, bcl-2 pozitivitesinin ise t(14;18) translokasyonu bağlı olup olmadığını söylemek mümkün değildir.

PTEN kromozom 10q23 lokusunda lokalize bir tümör süpresör gen olup, gen ürünü protein tirozin fosfataz ailesine üye bir proteindir.³⁰⁻³² PTEN hem protein, hem de lipid fosfataz özelliğine sahip bir dual fosfatazdır³³ ve bir enzimatik fonksiyonu olduğu bilinen ilk tümör süpresör moleküldür. PTEN, reseptör tirozin kinazlar tarafından hücre büyümesini ve çoğalmasını uyarıcı büyüme faktörleri ve sitokinler gibi ekstraselüler moleküllerden aldıkları sinyalleri hücre içine ileten PI3K/Akt yolağında fonksiyon görmektedir. Büyüme faktörleri ile uyarılan PI3K, hücre membranına bağlı PIP2'leri fosforilleyerek PIP3'e dönüştürmektedir. PIP3 ise, bir onkoprotein olan Akt molekülünü aktive eden bir ikincil mesaj molekülüdür. Aktive olan Akt intrasitoplazmik pek çok kinazın, transkripsiyon faktörünün ve hücre siklus regülatörü molekülünün fosforilasyonunu gerçekleştirerek hücreye gelen uyarıcı sinyallerin nükleusa iletilmesini sağlamaktadır. PTEN lipid fosfataz fonksiyonu ile lipid medyatör PIP3 molekülünü defosforile ederek inaktifleştirmektedir. PTEN'in tümör süpresör özelliği bu lipid fosfataz fonksiyonundan gelmektedir.³⁹ Hücre içi PTEN düzeyinin artması ve buna bağlı Akt inaktivasyonu hücre siklusunda G1 arresti ve apoptosise neden olur. PTEN fonksiyonu olmayan hücrelerde ise hücre proliferasyonu artmaktadır.

PTEN'in önemli bir özelliği de bir hücre iskeleti proteini olan tensin ile sekans homolojisi taşımasıdır. Tensin, fokal adhezyonlarda aktin filamentlerine bağlanan ve integrin-aracılı hücre adhezyonunda rol alan bir hücre iskeleti proteindir. Bu yüzden PTEN'in hücre iskeleti ve integrin fonksiyonunda da rol oynadığı düşünülmektedir. PTEN, protein tirozin fosfataz aktivitesi ile fosforile tirozin, serin ve treonin aminoasitlerini (fosfotirozil, fosfoseril ve fosfotreonil rezidülerini) parçalamaktadır. Bu gruptaki proteinlerden bir tanesi hücre-ekstraselüler matriks arası etkileşimde rol oynayan Fokal Adhezyon Kinazdır (FAK). Tamura ve ark.³⁴ PTEN'in hücre migrasyonu, hücre büyümesi, yayılması ve hücre iskeleti regülasyonu üzerine olan etkilerini bir çalışmalarında in vitro olarak araştırmış, PTEN ekspresyonu iki kat artırılmış fibroblastların yara yerindeki migrasyon yeteneklerinde belirgin bir azalma olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada PTEN'in aşırı ekspresyonunun protein fosfataz fonksiyonu ile FAK

defosforilasyonuna neden olarak fokal adhezyonda integrin-aracılı hücre sinyalleşmesini bozduğu ve böylece hücre yayılmasını selektif olarak azalttığı bulunmuştur. PTEN'in lipid fosfataz aktivitesindeki kayıp neoplastik gelişimden sorumlu iken, protein fosfataz aktivitesindeki bozuklukların (neoplastik) hücre çoğalması, migrasyonu ve yayılmasında rol oynadığı düşünülmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli primer ve metastatik tümörlerde 10q23 lokusunu ilgilendiren genetik anomali gösterilmiştir. PTEN anomalilerinin en sık gösterildiği neoplazmlar glioblastomlar, prostat, meme, endometrium ve tiroid karsinomları ile malign melanomlardır. Bunun dışında akciğer kanseri, baş-boyun bölgesinin skuamöz hücreli karsinomları, böbrek, mide ve kolorektal karsinomlarda da PTEN mutasyonları gösterilmiştir.⁴⁰ Literatürde solid neoplazmlar yanısıra lenfoid neoplaziler üzerinde daha az sayıda yapılan çalışmalarda, non-Hodgkin lenfomalarda ve bazı diğer lenfoproliferatif hastalıklarda PTEN'i ilgilendiren çeşitli genetik lezyonlar bildirilmiştir.⁵⁵⁻⁵⁹

Genetik lezyonların mekanizmaları çeşitlidir. Tümör süpresör genleri ilgilendiren klasik neoplastik transformasyon modellerinde, tümör süpresör genin önce bir allelinde mutasyon meydana gelmektedir. Daha sonra karşı allelin kaybı ile malign transformasyona kadar ilerleyen selektif bir proliferasyon süreci başlamaktadır. İkinci allelin kaybı (heterozigosite kaybı, *loss of heterozygosity*) sıklıkla geniş bir kromozom bölgesini ilgilendiren delesyonlar sonucu meydana gelmektedir. Heterozigosite kaybı delesyonlar yanısıra genom üzerinde nokta mutasyonlar veya insersiyon gibi mekanizmalarla da meydana gelebilmektedir. PTEN'de en sık gösterilen genetik anomaliler bu delesyonlar ve nokta mutasyonlardır.⁴⁰ Ancak genetik defekt her zaman genom üzerinde olmayabilir. Normal bir genom tarafından kodlanan bir proteinin transkripsiyonu sırasında da ortaya çıkabilir. Her durumda, sonuçta anormal bir gen ürünü ve buna bağlı fonksiyon bozuklukları (fonksiyon kaybı veya fonksiyon kazanımı) meydana gelmektedir.

PTEN mutasyonlarının glioblastomlarda ve çeşitli diğer yüksek dereceli ve ileri evre neoplazilerde sıklıkla saptanmış olması, PTEN kaybının neoplazilerin daha çok progresyon sürecinde rol aldığını düşündürmüştür. Ancak fare modellerinde yapılan çalışmaların bazılarında PTEN'in tek bir allelinin kaybında bile apoptosisin

engellendiği ve hücre proliferasyonunun arttığı gösterilmiştir.⁵⁴ Bu bulgu, tek alleldeki PTEN inaktivasyonun transforme olmuş hücrelerin erken evrelerde seçilmesi ve klonal çoğalmasında önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir. PTEN fonksiyonunun tam kaybı ise transforme olmuş hücrelerin artmış agresivitesinden ve metastatik potansiyelinden sorumlu olabilir. Glioblastomlarda ve yüksek dereceli ve metastatik prostat kansinomlarında PTEN geninde tam inaktivasyon gösterilmiştir. İnsan tümörlerinden baş-boyun skuamöz hücreli kansinomları ile endometrium ve over kanserlerinin erken evre lezyonlarda da PTEN anomalileri saptanmıştır. Endometrium kanserleri için preneoplastik kabul edilen endometrial hiperplazilerde de gösterilmiştir⁴⁸. Bu bulgular PTEN kaybının karsinogenez sürecinin sadece progresyon evresinde değil, erken evrelerinde de bulunduğunu ve bir başlatıcı rol de oynayabileceğini düşündürmektedir.

PTEN'in insan kanserlerinde en fazla mutasyonu gösterilen genlerden birisi olduğunu söylemek mümkündür. PTEN yalnızca tümör progresyonunda değil, preneoplastik lezyonlarda malign neoplastik transformasyon sürecinde ve muhtemelen neoplastik hücrelerin migrasyon ve yayılması aşamalarında da rol almaktadır.

Olgularımızda PTEN geninin durumu ileri moleküler teknikler ile araştırılmamış, PTEN mutasyonunun sorumlu genetik mekanizmalar bu çalışmada tartışılmamıştır. Bu çalışmada, PTEN gen inaktivasyonuna neden olabilecek olası genetik mekanizmaların büyük çoğunluğunun (homozigot delesyonlar, *nonsense* mutasyonlar, bazı internal delesyonlar, promoter metilasyonu yada posttranskripsiyonel modifikasyon) immünohistokimyasal olarak PTEN ekspresyon kaybına da yol açacağı düşünülmüş ve olası bir genetik anomalinin immünohistokimyasal olarak ekspresyon kaybı ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Ancak immünohistokimyasal yöntemle antijeni (gen ürünü molekülü) görmemize karşın fonksiyon görüp görmediği hakkında da bilgi edinmemiz mümkün değildir. Dolayısıyla immünoekspresyon kaybı olmasa dahi fonksiyon bozukluğu olasılığı mevcuttur.

Literatürde PTEN ekspresyon kaybına yönelik immünohistokimyasal çalışmalar mevcuttur. Bunlardan bazıları prostat, tiroid, meme ve baş-boyun bölgesi skuamöz hücreli kansinom olgularında yapılmıştır. Literatür bilgilerimize göre

çalışmamız non-Hodgkin lenfomalarda PTEN'e yönelik yapılmış ilk immünohistokimyasal çalışmadır. PTEN immünoaktivitesi sitoplazmik, perinükleer veya nükleer olabilmektedir. Literatürdeki klasik bilgilere göre PTEN ile nükleer lokalizasyon sinyali bildirilmemiştir³¹. Bu çeşitliliğin bir nedeni kullanılan PTEN antikoruındaki farklar olabilir. Ayrıca immünoboyamalar henüz tam aydınlatılmamış çeşitli nedenlerden dolayı hücrenin değişik kompartmanlarında görülebilmektedir. Nükleer PTEN immünoekspresyonunun olası nedenlerinden birisi de PTEN'in nükleusa bir *shuttle* mekanizma ile taşınması olabilir. İntrasitoplazmik substratlar hücre siklusunun değişik aşamalarında hücrenin değişik kompartmanlarına (sitoplazma, nükleus) yer değiştirebilmektedir. Buna benzer bir mekanizma ile p53, shuttleden sorumlu MDM2 molekülü ile nükleus ve sitoplazma arasında gidip gelmektedir⁹⁴. Normal tiroid dokusu ve tiroid neoplazmaları arasında nükleer ve sitoplazmik PTEN ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak karşılaştırıldığı Gimm ve ark.⁹⁵ tarafından yapılan bir çalışmada normal tiroid epitel hücrelerinde PTEN'in kuvvetli nükleer boyandığı, ancak sitoplazmik boyanmanın çok daha zayıf olduğu, buna karşın nükleer boyanma şiddetinin benign lezyonlarda azaldığı, malign lezyonlarda özellikle indiferansiye karsinomlarda nükleer boyanmanın hemen tamamen kaybolduğu bildirilmiştir. Bu çalışmadakine benzer şekilde bizim olgularımızda da normal dokularda (epitel, endotel) nükleer boyanma mevcuttur.

Çalışmamıza dahil edilen 102 DBBHL olgusunun 67'sinde (%65,7) PTEN ile nükleer boyanma elde edilmiştir. PTEN ile bu nükleer boyanma gerçek bir boyanmadır çünkü 35 olguda (%34,3) neoplastik hücrelerde, normal kontrol hücreleri (epitel, damar endoteli, reaktif lenfositler) ile karşılaştırıldığında PTEN boyanma şiddetinde belirgin bir azalma saptanmıştır. Literatürde, non-Hodgkin lenfomalardaki ilk çalışmalardan birisi Nakahara ve ark. tarafından bildirilmiştir.⁵⁶ Bu çalışmada 19'u B, 10'u T hücreli olmak üzere 29 NHL olgusu incelenmiştir. PCR gibi moleküler yöntemler kullanılarak yapılan bu çalışmanın sonucunda 1 olguda PTEN'de genomik delesyon, 2 olguda ise PTEN transkriptlerinde, bir başka deyişle PTEN proteinin enzimatik aktivitelerinde defekt saptanmıştır. Buna benzer diğer çalışmaların sonucunda NHL patogeneğinde PTEN gen defektini veya mRNA transkriptlerini ilgilendiren lezyonların da rol oynayabileceği görülmüştür. Nakahara'nın çalışmasında 29 lenfoma olgusunun 3'ünde (%10,3), Grønbaek ve

ark.⁵⁷ tarafından 39 DBBHL olgusunun 2'sinde (%5), Sakai ve ark.⁵⁸ tarafından 67 yüksek dereceli lenfoma olgusunun 3'ünde (%10), Butler ve ark.⁵⁹ tarafından ise 63 NHL olgusunun 2'sinde (%3) moleküler teknikler ile PTEN mutasyonları gösterilmiştir.

102 DBBHL olgusunda PTEN immünekspresyonunu araştırdığımız bu çalışma, literatür bilgilerimize göre en büyük DBBHL serisini oluşturmaktadır. Toplam 35 (%34,3) olguda PTEN kaybı gözlenmiştir. Bizim olgularımızdaki oran diğer araştırmacıların oranlarından daha yüksektir. Bunun bir nedeni çalışma grubumuzun daha büyük olması olabilir. Bir diğer neden de çalışmamızın immünhistokimyasal yöntem ile, bir başka deyişle ışık mikroskopu ile, subjektif ve hatalı yoruma yol açabilecek görsel yoruma dayalı bir yöntem ile yapılmış olması olabilir. PTEN ekspresyonun değerlendirilmesinde immünhistokimyasal yöntem ile moleküler yöntemleri karşılaştıran bir çalışmada, immünhistokimyasal boyanma şiddetinin azalmasına paralel olarak ileri moleküler tekniklerle tespit edilen heterozigosite kaybı oranlarının arttığı gösterilmiştir.⁹⁵ Moleküler tekniklerin genetik lezyonları tespit etmekteki üstünlüğü çok daha fazla olmasına karşın Gimm ve arkadaşlarının çalışmasındaki bu bulgu, immünboyamadan elde edilen sonuçların üstün tekniklerle elde edilen sonuçlarla korele olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda PTEN kaybı saptanan 35 olgunun 19'u (%54,3) sentroblastik, 8'i (%22,9) anaplastik, 4'ü (%11,4) Burkitt benzeri, 3'ü (%8,6) T hücreden zengin, 1'i (%2,9) ise immünoblastik tip lenfomadır. PTEN kaybı belirli bir lenfoma tipi ile korele bulunmamıştır. Bunun muhtemel bir nedeni olgularımızı meydana getiren lenfoma tipinin daha çok sentroblastik lenfomalar olmasıdır. Bu yüzden olgular sentroblastik ve sentroblastik olmayan lenfomalar olarak iki ana gruba ayrıldığında PTEN ekspresyon kaybının ikinci grupta daha fazla olduğu görülmüştür ve bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($\chi^2=5,913$ $p=0,05$). Sentroblastik lenfomaların %26,7'si, sentroblastik olmayan lenfomaların ise %51,6'sında PTEN ekspresyon kaybı mevcuttur. İki grup arasındaki 2 kata yakın bu farkın nedeni, sentroblastik lenfomaların biyolojik seyirlerinin ikinci grubu meydana getiren lenfomalardan daha iyi olması olabilir. Ya da tam tersine, sentroblastik lenfomaların biyolojik seyirlerinin diğer (anaplastik, immünoblastik, Burkitt benzeri) lenfomalardan daha iyi olmasının nedenlerinden birisi, PTEN ekspresyon kaybının

daha az oranda olması olabilir. Artmış Ki-67 işaretlenme indeksine göre daha agresif seyirli olduğunu düşündüğümüz Burkitt-benzeri, immünoblastik ve anaplastik lenfoma olguları ile PTEN kaybı arasında, muhtemelen bu olguların sayısının az olması nedeniyle bir korelasyon saptanmamıştır. Hastalığın biyolojik seyri ve PTEN ekspresyonu arasındaki olası bir ilişkiyi saptamak amacıyla olguların sağkalım oranları incelenmiş ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Takibi olan 79 olgu içerisinde PTEN kaybı 25'tir (%31,6). Bu olguların 8'i (%32) ölmüştür. Hayatta kalan olguların 6'sında (%24) tam remisyona sağlanmış olup, 11'inde (%44) ise hastalık devam etmektedir. Bu oranlar literatürde bildirilen genel DBBHL sağkalım oranlarına yakındır. Çalışma grubumuzdaki olguların klinik verileri tüm hastalarda elde edilememiştir. Tüm hastaların tanı anındaki evresi ve Uluslararası Prognostik İndeks (IPI) skoru gibi sağkalımı etkileyecek bilgileri hastaların tümünde ulaşılamamıştır. Hastaların standart kemoterapi protokolü CHOP olmakla birlikte daha agresif ve bu tedaviye rezistan bazı olgular diğer kemoterapötik ajanların da kombinasyonu ile tedavi edilmişlerdir. Bu nedenle tedavi şekillerinde bazı farklılıklar da söz konusudur. Olgular hakkındaki mevcut bilgilerimize göre PTEN'in bağımsız bir faktör olarak sağkalımı etkilemediği saptanmıştır.

Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular, immünohistokimyasal olarak tespit etmeye çalıştığımız PTEN kaybının bazı DBBHL'lerin patogenezinde rol oynayabileceğini göstermektedir. PTEN kaybının sentroblastik dışı DBBHL olgularında daha yüksek oranda görülmesi, PTEN kaybının kötü bir prognostik faktör olarak da değerlendirilebileceğini düşündürmüştür. Bu konu hakkında daha fazla çalışmaya gereksinim vardır. Kompleks bir hastalık olan DBBHL tedavisi için yakın gelecekte geliştirilecek yeni tedavi şekillerinde, ekspresyon kaybı gösterilmiş olgularda PTEN molekülü hedef olarak seçilebilir. PTEN'i ilgilendiren çeşitli genetik mekanizmaların tek bir teknik ile gösterildiği immünohistokimya ise rutin uygulamalarda tercih edilebilecek değerli bir yöntem olarak kullanılabilir.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. WHO sınıflamasına göre DBBHL'ler en büyük ve hem histomorfolojik, hem de genetik defektler açısından en heterojen non-Hodgkin lenfoma grubunu oluşturmaktadır.
2. Pek çok malign neoplazide olduğu gibi lenfomalarda görülen genetik anomaliler onkogenleri ilgilendiren kromozom translokasyonları, tümör süpresör genlerindeki delesyonlar ve mutasyonlar, değişik sayısal kromozom anomaliler ve diğer çeşitli genetik kusurlardır. DBBHL olgularının farklı klinik seyirlerinden ve tedaviye verdikleri farklı yanıtlardan bu genetik heterojenite de sorumlu tutulmaktadır. Patogenezden sorumlu olası moleküler genetik defektlerin tespiti, diğer malign neoplazilerde olduğu gibi, lenfoproliferatif hastalıkların da daha iyi anlaşılması ve daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için gereklidir.
3. Çeşitli malign neoplazilerde genetik defekti gösterilmiş bir tümör süpresör gen olan PTEN'in lenfomagenez sürecindeki rolü immünohistokimyasal yöntemlerle araştırıldığında, olgularımızın %34,3'ünde ekspresyon kaybı saptanmıştır. Bu bulgu, PTEN'in DBBHL olgularının da bir kısmında patogenezden sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. PTEN kaybı sentroblastik olmayan DBBHL tiplerinde daha yüksek orandadır. Bunun bir nedeni, immünoblastik ve Burkitt benzeri tip gibi daha agresif seyrettiği bilinen DBBHL tiplerinin bu grupta yer alması olabilir. PTEN kaybı ile lenfoma lokalizasyonları ve diğer immünohistokimyasal belirleyiciler arasında bir ilişki saptanmamıştır. PTEN kaybı olan olgularda ölüm oranı %32, hayatta kalma oranı ise %68'dir. Bu rakamlar PTEN kaybı saptanmayan olgulardaki oranlarla hemen hemen aynıdır. Sonuç olarak, immünohistokimyasal olarak PTEN ile boyanma kaybına göre değerlendirdiğimiz PTEN gen ekspresyon anomalileri diffüz büyük B hücreli lenfomalarda da görülebilmektedir. Ancak lenfomagenezden sorumlu mekanizmalardan birisi olabileceğini düşündüğümüz PTEN ekspresyon kaybının, DBBHL olgularının sağkalımı üzerinde bir etkisi saptanmamıştır.

KAYNAKLAR

1. The non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;89:3909-3918.
2. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. (Eds.): World Health Organization of Tumours. Pathology and Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon, 2001.
3. Dalla-Favera R, Ye BH, Lo Coco F, ve ark. Identification of genetic lesions associated with diffuse large cell lymphoma. *Ann Oncol* 1994;5 Suppl 1:55-60.
4. Rappaport H: Tumors of the hematopoietic system. In: Atlas of Tumor Pathology, section III, Fascicle 8. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology,1996.
5. Gerard-Marchant R, Hamlin I, Lennert K, ve ark. Classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Lancet* 1974,ii:586.
6. Stansfeld A, Diebold J, Kapanci Y, ve ark. Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet* 1988;1:292-293.
7. Non-Hodgkin's lmyphoma pathologic classification project: National Cancer Institute sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a Working Formulation for clinical usage. *Cancer* 1982;49:2112-2135.
8. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, ve ark. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84:1361-1392.
9. Jaffe ES, Harris NL, Chan JKC, ve ark. Proposed World Health Organization classification of neoplastic diseases of hematopoietic and lymphoid tissues. *Am J Surg Pathol* 1997;21:114-121.
10. Jaffe ES, Harris NL, Diebold J, ve ark. World Health Organization classification of lymphomas: a work in progress. *Ann Oncol* 1998;9 Suppl 5:S25-30.

11. Tondini C, Zanini M, Lombardi F, ve ark. Combined modality treatment with primary CHOP chemotherapy followed by locoregional irradiation in stage I or II histologically aggressive non-Hodgkin's Lymphomas. *J Clin Oncol* 1993;11:720-725.
12. Dana BW, Dahlberg S, Miller TP, ve ark. m-BACOD treatment for intermediate- and high-grade malignant lymphomas: a Southwest Oncology Group phase II trial. *J Clin Oncol* 1990;8:1155-1162.
13. O'Reilly SE, Hoskins P, Klimo P, ve ark. MACOP-B and VACOP-B in diffuse large cell lymphomas and MOPP/ABVD in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 1991;2(suppl 1):17-23.
14. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, ve ark. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-511.
15. Schlegelberger B, Zwingers T, Harder L, ve ark. Clinicopathogenetic significance of chromosomal abnormalities in patients with blastic peripheral B-cell lymphoma. Kiel-Wien-Lymphoma Study Group. *Blood* 1999;94:3114-3120.
16. Engelhard M, Brittinger G, Huhn D, ve ark. Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. *Blood* 1997;89:2291-2297.
17. Salar A, Fernandez de Sevilla A, Romagosa V, ve ark. Diffuse large B-cell lymphoma : Is morphologic subdivision useful in clinical management ? *Eur J Haematol* 1998;60:202-208.
18. Mirchandani I, Palutke M, Tabaczka P, ve ark. B-cell lymphomas morphologically resembling T-cell lymphomas. *Cancer*. 1985;56:1578-1583.
19. Ramsay AD, Smith WJ, Isaacson PG. T-cell-rich B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 1988;12:433-443.
20. Stein H, Mason DY, Gerdes J, ve ark. The expression of the Hodgkin disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 1985;66:848-858.

21. Stein H, Foss HF, Dürkop H, ve ark. CD30⁺ anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood* 2000; 96:3681-3695.
22. Liebow AA, Carrington CR, Friedman PJ. Lymphomatoid granulomatosis. *Hum Pathol* 1972;3:457-558.
23. Katzenstein AL, Carrington CB, Liebow AA. Lymphomatoid granulomatosis: a clinicopathologic study of 152 cases. *Cancer* 1979;43:360-373.
24. Guinee D Jr, Jaffe E, Kingma D, ve ark. Pulmonary lymphomatoid granulomatosis: evidence for a proliferation of Epstein-Barr virus infected B-lymphocytes with a prominent T-cell component and vasculitis. *Am J Surg Pathol* 1994;18:753-764.
25. Delecluse HJ, Anagnostopoulos I, Dallenbach F, ve ark. Plasmablastic lymphomas of the oral cavity: a new entity associated with the human immunodeficiency virus infection. *Blood* 1997;89:1413-1420.
26. Perrone T, Frizzera G, Rosai J. Mediastinal diffuse large-cell lymphoma with sclerosis. A clinicopathologic study of 60 cases. *Am J Surg Pathol* 1986;10:176-191.
27. Möller P, Lämmle B, Eberlein-Gonska M, ve ark. Primary mediastinal clear cell lymphoma of B cell type. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1986;409:79-92.
28. Al-Sharabati M, Chittal S, Duga-Neulet I, ve ark. Primary anterior mediastinal B-cell lymphoma: A clinicopathological and immunohistochemical study of 16 cases. *Cancer* 1991;67:2579-2587.
29. Nador RG, Cesarman E, Chadburn A, ve ark. Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpes virus. *Blood* 1996;88:645-656.
30. Li J, Yen C, Liaw D, ve ark. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275:1943-1947.

31. Li DM ve Sun H: TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor β Cancer Res 1997;57:2124-2129.
32. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, ve ark. Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. Nat Genet 1997;15:356-362.
33. Myers MP, Stolarov JP, Eng C, ve ark. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:9052-9057.
34. Tamura M, Gu J, Matsumoto K, ve ark. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. Science 1998;280:1614-1617.
35. Paez J ve Sellers WR. PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling. Cancer Treat Res 2003;115:145-67.
36. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. J Biol Chem 1998;273:13375-13378.
37. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, ve ark. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. Cell 1998;95:29-39.
38. Sun M, Lesche R, Li DM, ve ark. PTEN regulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:6199-6204.
39. Myers MP, Pass I, Batty IH, ve ark. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:13513-13518.
40. Ali IU, Schriml LM, Dean M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. J Natl Cancer Inst 1999;91:1922-1932.

41. Bostrom J, Cobbers JM, Wolter M, ve ark. mutation of PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q. *Cancer Res* 1998;58:29-33.
42. Rasheed BK, Stenzel TT, McLendon RE, ve ark. PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res* 1997;57:4187-4190.
43. Wang SI, Puc J, Li J, ve ark. Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 1997;57:4183-4186.
44. McMenamin ME, Soung P, Perera S, ve ark. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res* 1999;59:4291-4296.
45. Obata K, Morland SJ, Watson RH, ve ark. Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer Res* 1998;58:2095-2097.
46. Yokomizo A, Tindall DJ, Hartman L, ve ark. Mutation analysis of the putative tumor suppressor PTEN/MMAC1 in human ovarian cancer. *Int J Oncol* 1998;13:101-105.
47. Levine RL, Cargile CB, Blazes MS, ve ark. PTEN mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia, a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma. *Cancer Res* 1998;58:3254-3258.
48. Maxwell GL, Risinger JJ, Gumbs C, ve ark. Mutation of the PTEN tumor suppressor gene in endometrial hyperplasias. *Cancer Res* 1998;58:2500-2503.
49. Guldberg P, Straten P, Birck A, et al. Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res* 1997;57: 3660-3663.
50. Rhei E, Kang L, Bogomolny F, et al. Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in primary breast carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57:3657-3659.
51. Dahia PL, Marsh DJ, Zheng Z, ve ark. Somatic deletions and mutations in the Cowden disease gene, PTEN, in sporadic thyroid tumors. *Cancer Res* 1997;57:4710-4713.

52. Liaw D, Marsh DJ, Li J, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 1997;16:64-67.
53. Marsh DJ, Dahia PL, Zheng Z, et al. Germline mutations in PTEN are present in Bannayan-Zonana syndrome. *Nat Genet* 1997;16:333-334.
54. DiCristofano A ve Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 2000;100:387-390.
55. Speaks SL, Sanger WG, Mashi AS, ve ark. Recurrent abnormalities of chromosome bands 10q23-25 in non-Hodgkin's lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1992; 5:239-243.
56. Nakahara Y, Nagai H, Kinoshita T, ve ark. Mutational analysis of the PTEN/MMAC1 gene in non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 1998;12:1277-1280.
57. Grønbaek K, Zeuthen J, Ralfkiaer E, ve ark. Alterations of the MMAC1/PTEN gene in lymphoid malignancies. *Blood* 1998; 9:4388-4390.
58. Sakai A, Thieblemont C, Wellmann A ve ark., PTEN gene alterations in lymphoid neoplasms. *Blood* 1998;92:3410-3415.
59. Butler MP, Wang SI, Chaganti RS, ve ark. Analysis of PTEN mutations and deletions in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;24:322-327.
60. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, ve ark. Cloning the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14; 18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226:1097-1099.
61. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, ve ark. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985;41:899-906.
62. Cleary ML ve Sklar J: Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:7439-7443.

63. Hockenberry D, Zutter M, Hickey W, ve ark. BCL-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6961-6965.
64. Tsujimoto T, Cossma J, Jaffe E, ve ark. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985;288:1440-1443.
65. Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, ve ark. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med* 1987;317:1185-1189.
66. Aisenberg AC, Wilkes BM, Jacobson JO: The bcl-2 gene is rearranged in many diffuse B-cell lymphomas. *Blood* 1988;71:969-972.
67. Monni O, Franssila K, Joensuu H, ve ark. BCL-2 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1999;34:42-52.
68. Rantanen S, Monni O, Joensuu H, ve ark. Causes and consequences of BCL-2 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2001;42:1089-1098.
69. King BE, Chen C, Locker J, ve ark. Immunophenotypic and genotypic markers of follicular center cell neoplasia in diffuse large B-cell lymphomas. *Modern Pathology* 2000;13:1219-1231.
70. Pezzella F, Tse AG, Cordell JL, ve ark. Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol* 1990;137:225-232.
71. Monni O, Joensuu H, Franssila K et al. BCL-2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1997;90:1168-1174.
72. Rao PH, Houldsworth J, Dyomina K, et al. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998;92: 234-240.
73. Barrans SL, Carter I, Owen RG, ve ark. Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2002;99:1136-1143.

74. Kramer MH, Hermans J, Parker J, ve ark. Clinical significance of bcl-2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol.* 1996;14:2131-2138.
75. Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, ve ark. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* 1996;88:1046-1051.
76. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, ve ark. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma *Blood* 1997;90:244-251.
77. Hermine O, Haioun C, Lepage E, ve ark. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood* 1996; 87: 265–272.
78. Sanchez E, Chacon I, Plaza MM, ve ark. Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1931–9.
79. Miyashita T ve Reed JC. Bcl-2 gene transfer increases relative resistance to S49.1 and WEH17.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 1992;52:5407-5411.
80. Miyashita T, ve Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993;81:151-
81. Bubien JK, Bell PD, Frizzell RA, ve ark. CD20 directly regulates transmembrane ion flux in B-lymphocytes. *Leukocyte Typing* 1989;IV:51-54.
82. Rosai J (Ed). *Ackerman's Surgical Pathology*, 8th ed. St. Louis, MO: Mosby, 1996.
83. Stein H, Gerdes J, Schwab U, et al. Identification of Hodgkin and Sternberg-Reed cells as a unique cell type derived from a newly-detected small-cell population. *Int J Cancer* 1982;30:445-459.
84. Hall PA, D'Ardenne AJ, Stansfeld AG. Paraffin section immunohistochemistry. II. Hodgkin's disease and large cell anaplastic (Ki1) lymphoma. *Histopathology.* 1988;13:161-169.

85. Delsol G, Al-Saati TA, Gatter KC, ve ark. Coexpression of epithelial membrane antigen (EMA), Ki-1, and interleukin-2 receptor by anaplastic large cell lymphomas: diagnostic value in so-called malignant histiocytosis. *Am J Pathol* 1988;130:59-70.
86. Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, et al: Assignment of the human Ki-67 gene (MK167) to 10q25-qter. *Genomics* 1991;11:476-477.
87. Brown DC ve Gatter KC: Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 2002,;40:2-11.
88. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, ve ark. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:1937-1947.
89. Uchida T, Watanabe T, Kinoshita, T, ve ark. Mutational analysis of the CDKN2 (MTS1/p16ink4A) gene in primary B-cell lymphomas. *Blood* 1995,86;2724-2731.
90. Ichikawa A, Hotta T, Takagi N, ve ark. Mutations of p53 gene and their relation to disease progression in B- cell lymphoma. *Blood* 1992,79,2701-2707
91. Meijerink JPP: t(14;18), a journey to eternity. *Leukemia* 1997;11:2175-2187.
92. Tilly H, Rossi A, Stamatoullas A, ve ark. Prognostic value of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma. *Blood* 1994;84:1043-1049.
93. Siebert R, Gesk S, Harder S, ve ark. Deletions in the long arm of chromosome 10 in lymphomas with t(14;18): A pathogenetic role of the tumor suppressor genes PTEN/MMAC1 and MXI1? *Blood* 1998;92:4487-4489.
94. Freedman DA, Wu L, ve Levine AJ. Function of MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:96-107.
95. Gimm O, Perren A, Weng LP, ve ark. Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol* 2000;156:1693-1700.

EK 1. Lenfoid hücre neoplazmlarının WHO Sınıflaması

B-hücreli neoplazmlar

- Prekürsör B-hücreli neoplazm: B-lenfoblastik lösemi/lenfoma (prekürsör B-hücreli akut lenfoblastik lenfoma)
- Matür (periferel) B-hücreli neoplazmlar
 - B-hücreli kronik lenfositik lösemi/ küçük lenfositik lenfoma
 - B-hücreli prolenfositik lösemi
 - Lenfoplazmasitik lenfoma
 - Splenik marjinal zon B-hücreli lenfoma (± villöz lenfositler)
 - Hairy cell* lösemi
 - Plazma hücreli myelom /plazmasitom
 - Mucosa-associated* lenfoid dokunun (MALT) ektranodal majinal zon B-hücreli lenfoması
 - Folikül merkez hücreli lenfoma
 - Mantle hücreli lenfoma
 - Diffüz büyük B-hücreli lenfoma
 - Mediastinal büyük B-hücreli lenfoma
 - Primer effüzyon lenfoması
 - Intravasküler büyük B hücreli lenfoma
 - Burkitt lenfoma / Burkitt-hücreli lösemi

T ve NK hücreli neoplazmlar

- Prekürsör T-hücreli neoplazm: Prekürsör T-lenfoblastik lenfoma/lösemi (prekürsör T-hücreli akut lenfoblastik lösemi)
- Matür (periferel) T-hücreli neoplazmlar
 - T-hücreli prolenfositik lösemi
 - T-hücreli granüler lenfositik lösemi
 - Agresif NK-hücreli lösemi
 - Erişkin T-hücreli lenfoma/lösemi (HTLV1+)
 - Ektranodal NK/T-hücreli lenfoma, nazal tip
 - Enteropati tipi T-hücreli lenfoma
 - Hepatosplenik $\gamma\delta$ T-hücreli lenfoma
 - Subkütanöz pannikülit-benzeri T-hücreli lenfoma
 - Mikozis fungoides/ Sezary sendromu
 - Anaplastik büyük hücreli lenfoma, T/*null* hücreli, primer kütanöz tip
 - Periferel T-hücreli lenfoma, NOS
 - Anjiyoimmünoblastik T-hücreli lenfoma
 - Anaplastik büyük hücreli lenfoma, T/*null* hücreli, primer sistemik tip

Hodgkin Lenfoma (Hodgkin hastalığı)

- Nodüler lenfosit predominant HL
- Nodüler sklerozis HL
- Lenfosit zengin klasik HL
- Mikst sellüler HL
- Lenfosit yoksun tip HL

NK: *natural killer*

EK 2: Olgu listesi
(DBBHL histolojik tiplerine göre sıralanmıştır)

Sıra	Biyopsi No	Yaş	Cinsiyet	Lokalizasyon	Histolojik tip	CD20	CD30	EMA	Ki-67 (%)	bcl-2	PTEN (kayıp)	Durum
10	1390.02	56	E	Akciğer	Anaplastik	+	+	-	60-70	+f	Yok	HS
13	62.02	48	K	LN	Anaplastik	+	+	+f	80-90	+	Var	HS
17	392.01	63	E	Maksilla	Anaplastik	+	-	-	80-90	+	Yok	
18	2806.01	68	K	Tonsil	Anaplastik	+	-	-		+	Yok	HS
20	4315.01	31	E	Sakral	Anaplastik	+	+	+	95-100	+	Var	TR
21	4391.01	40	K	Mide	Anaplastik	+	+	-	40-50	+	Var	TR
25	15673.01	63	K	Mide	Anaplastik	+	+	+	80-90	+	Var	Ex
28	15487.01	53	E	LN	Anaplastik	+	+f	+f	70	+f	Yok	HS
52	15016.99	66	E	Tonsil	Anaplastik	+	+	+f	80-90	+	Yok	HS
57	7959.01	70	K	LN	Anaplastik	+	-	+	30-40	+	Var	Ex
61	1166.01	32	K	Timus	Anaplastik	+	-	-	70-80	+f	Var	HS
70	14294.02	71	K	Dalak	Anaplastik	+	+	-	80-90	-	Var	HS
73	7601.99	52	K	LN	Anaplastik	+	-	+	80-90	+	Yok	HS
99	4661.00	33	E	Tonsil	Anaplastik	+	+f	-	80-90	-	Yok	HS
84	4257.00	34	K	Timus	Anaplastik	+	-	-		-	Var	
15	3241.02	17	E	LN	Burkitt benzeri	+	-	-	> 95%	-	Var	HS
30	16700.02	49	E	LN	Burkitt benzeri	+	-	-	>90	+	Yok	HS
34	14394.01	48	K	Intra-abdominal	Burkitt benzeri	+	-		90-100	+f	Yok	
48	10431.99	61	K	LN	Burkitt benzeri	+	-	-	95-99	-	Var	
51	15432.00	17	E	İleum	Burkitt benzeri	+	-	-	80-90	-	Var	TR
63	15069.01	35	K	Uyluk	Burkitt benzeri	+	-	-	90	-	Var	Ex

LN: Lenf nodu, GIS: Gastrointestinal sistem, HS: Hastalıklı sağ, TR: Tam remisyon, Ex: Eksitüs, +f:Fokal pozitif, Boş kutular: Değerlendirilemeyen

Sıra	Biyopsi No	Yaş	Cinsiyet	Lokalizasyon	Histolojik tip	CD20	CD30	EMA	Ki-67 (%)	bcl-2	PTEN (kayıp)	Durum
68	2010.99	55	E	LN	Burkitt benzeri	+	-	-	70	+	Yok	HS
100	1569.01	67	E	LN	Burkitt benzeri	+	-	-	95	-	Yok	Ex
12	473.02	71	K	LN	İmmünoblastik	+	-	-		+	Var	
41	15904.99	39	E	İnce barsak + Kolon	İmmünoblastik	+	-	-	80	+	Yok	
101	7386.00	55	E	Nazal mukoza	İmmünoblastik	+	-	-	80-90	+	Yok	TR
67	2278.99	42	E	Tonsil	Sentroblastik	+	-	-		+	Var	HS
76	7417.00	52	K	Çekum	Sentroblastik	+	-	+f	70	-	Yok	
1	4467.02	63	K	LN	Sentroblastik	+	-	+	90	+	Yok	
2	8494.02	59	K	Klivus	Sentroblastik	+	-	-	50	+	Yok	HS
3	8187.02	19	K	İnguinal	Sentroblastik	+	-	-		-	Yok	HS
4	4876.02	68	K	LN	Sentroblastik	+	-	-	80-90	+	Yok	HS
5	7547.02	69	E	LN	Sentroblastik	+	-	-	40-50	+	Yok	HS
6	3390.02	29	E	Mide	Sentroblastik	+	-	-	>90	-	Yok	TR
7	3628.02	64	E	LN	Sentroblastik	+	-	-		-	Yok	HS
8	11319.02	63	K	LN	Sentroblastik	+	-	-		+	Var	TR
9	1868.02	55	E	Dalak	Sentroblastik	+	-	-	80-90	+	Yok	HS
11	7971.02	53	K	Vertebra	Sentroblastik	+	-	+f	80	-	Yok	Ex
14	226.02	49	K	LN	Sentroblastik	+	-	+	5-10	+	Yok	TR
19	2819.01	48	K	İntra-abdominal	Sentroblastik	+	-	-	80-90	+f	Yok	
22	14262.01	75	K	Mide	Sentroblastik	+	-	-	90	-	Var	HS
23	8512.02	32	E	Timus	Sentroblastik	+	+	-		-	Yok	Ex

LN:Lenf nodu, GIS: Gastrointestinal sistem, HS: Hastalıklı sağ, TR: Tam remisyon, Ex: Eksitüs, +f:Fokal pozitif, Boş kutular: Değerlendirilemeyen

Sıra	Biyopsi No	Yaş	Cinsiyet	Lokalizasyon	Histolojik tip	CD20	CD30	EMA	Ki-67 (%)	bcl-2	PTEN (kayıp)	Durum
24	13797.01	40	K	Timus	Sentroblastik	+	-	-	20-30	-	Yok	Ex
26	13981.01	60	E	Mide	Sentroblastik	+	-	-	70-80	?	Yok	TR
27	15238.01	101	K	LN	Sentroblastik	+	+	-	90	+	Yok	
29	16350.01	46	E	İnce barsak	Sentroblastik	+	-	-	80-90	-	Var	
31	16062.01	29	E	LN	Sentroblastik	+	-	-	10	-	Yok	TR
32	14844.01	63	E	LN	Sentroblastik	+	-	-	90	-	Yok	TR
33	15003.01	37	K	LN	Sentroblastik	+	+	-	90	+f	Yok	
35	14278.01	46	E	LN	Sentroblastik	+	-	+f	80	+	Yok	HS
36	7296.02	66	K	Endometrium	Sentroblastik	+	-	-	-	-	Yok	HS
37	4405.91	71	K	Meme	Sentroblastik	+	-	-	80	-	Yok	
38	6660.99	40	E	LN	Sentroblastik	+	-	+	-	+	Yok	TR
40	8988.02	55	K	LN	Sentroblastik	+	+	-	-	-	Var	
42	9867.02	67	K	Over	Sentroblastik	+	-	-	10-20	+	Yok	HS
43	3876.99	70	K	LN	Sentroblastik	+	-	-	90	+	Yok	
44	9738.02	49	K	Over	Sentroblastik	+	-	-	-	+	Yok	HS
45	4604.99	70	E	LN	Sentroblastik	+	-	-	60	+	Yok	
46	13956.00	56	E	LN	Sentroblastik	+	-	-	60	-	Yok	HS
47	13616.99	79	K	Duodenum	Sentroblastik	+	-	-	-	-	Yok	HS
49	12489.99	83	E	Mide	Sentroblastik	+	-	-	-	-	Yok	
50	14451.99	43	E	İleocekal	Sentroblastik	+	-	+	60	+	Var	TR
53	16124.99	75	E	Testis	Sentroblastik	+	-	-	-	-	Var	HS
54	15162.99	50	E	Dil	Sentroblastik	+	-	-	80	+	Yok	

LN: Lenf nodu, GIS: Gastrointestinal sistem, HS: Hastalıklı sağ, TR: Tam remisyon, Ex: Eksitüs, +f:Fokal pozitif, Boş kutular: Değerlendirilemeyen

Sıra	Biyopsi No	Yaş	Cinsiyet	Lokalizasyon	Histolojik tip	CD20	CD30	EMA	Ki-67 (%)	bc1-2	PTEN (kayıp)	Durum
55	7276.99	80	K	LN	Sentroblastik	+	+	-	20-30	+	Var	
56	7543.01	55	E	Yanak	Sentroblastik	+	-	-	90-95	+	Yok	Ex
58	9087.01	71	E	Mide	Sentroblastik	+	-	-	80-90	-	Yok	Ex
59	11967.01	24	K	Mide	Sentroblastik	+	+	+	90	-	Var	HS
60	9740.01	60	E	Beyin	Sentroblastik	+	-	-	60-70	+	Yok	Ex
64	15131.00	59	K	Asetabulum	Sentroblastik	+	+	-	60-70	+	Yok	TR
66	13037.00	33	K	Dil	Sentroblastik	+	-	-		+	Yok	HS
69	2336.01	47	E	Kemik iliği	Sentroblastik	+	-	-		-	Var	Ex
71	10533.99	49	E	Serebellum	Sentroblastik	+	-	+f	40	+	Var	
72	12308.91	60	E	LN	Sentroblastik	+	-	-		+	Yok	Ex
74	15073.00	67	K	Tonsil	Sentroblastik	+	-	+f	80-90	+	Yok	TR
75	6499.02	70	K	Tonsil	Sentroblastik	+	-	-	30-40	+	Var	Ex
78	13917.01	68	K	Mezenter	Sentroblastik	+	-	-	40-50	+	Yok	Ex
79	9100.00	17	E	İleum	Sentroblastik	+	-	-	80	-	Yok	Ex
80	7599.00	53	E	Tonsil	Sentroblastik	+	-	-	80-90	+	Yok	HS
81	15615.00	46	E	LN	Sentroblastik	+	-	-	90	+	Yok	HS
83	15790.00	36	E	LN	Sentroblastik	+	-	-		+	Var	HS
85	8147.02	42	K	Tonsil	Sentroblastik	+	-	-		-	Yok	TR
86	9558.02	59	K	Over + uterus	Sentroblastik	+	-	-		+	Yok	HS
87	9253.00	49	K	Uterus	Sentroblastik	+	-	-	90	*	Var	Ex
88	9862.00	60	E	LN	Sentroblastik	+	-	-	80-90	+	Var	
89	9887.00	36	E	LN	Sentroblastik	+	-	-	80-90	+	Var	HS
90	5169.00	53	K	Tonsil	Sentroblastik	+	-	-	90	+	Var	

LN: Lenf nodu, GIS: Gastrointestinal sistem, HS: Hastalıklı sağ, TR: Tam remisyon, Ex: Ekstius, +f:Fokal pozitif, Boş kutular: Değerlendirilemeyen

Sıra	Biyopsi No	Yaş	Cinsiyet	Lokalizasyon	Histolojik tip	CD20	CD30	EMA	Ki-67 (%)	bcl-2	PTEN (kayıp)	Durum
91	13216.02	67	K	LN	Sentroblastik	+	-	-	30	+	Var	TR
92	10709.02	51	E	Dil	Sentroblastik	+	+	-	50-60	-	Yok	Ex
93	1261.00	64	K	Kolon	Sentroblastik	+	-	-	30-40	+	Yok	
94	2063.00	44	K	LN	Sentroblastik	+	-	-	30	+	Yok	Ex
95	2293.00	46	K	Dil	Sentroblastik	+	-	-	60	+	Yok	HS
96	3924.00	75	E	LN	Sentroblastik	+	-	-	30-40	-	Var	
97	7134.00	60	K	Dalak	Sentroblastik	+	-	-	50	+	Yok	HS
98	4395.00	40	K	LN	Sentroblastik	+	-	-	80	+	Yok	
102	8221.00	66	E	Böbrek	Sentroblastik	+	-	-	20	-	Yok	
39	6677.99	36	E	Timus	Sentroblastik	+	-	-		+	Yok	
16	11884.01	35	E	LN	T hücreden zengin	+		+	80	+	Var	HS
62	1143.01	52	E	LN	T hücreden zengin	+	+	-	80-90	+	Var	Ex
65	13289.00	61	E	Akciğer	T hücreden zengin	+	+	-	80	-	Yok	Ex
77	15274.00	11	K	LN	T hücreden zengin	+	+	-	80-90	-	Yok	HS
82	15776.00	38	E	LN	T hücreden zengin	+	-	+	50-60	+ f	Var	Ex

LN: Lenf nodu, GIS: Gastrointestinal sistem, HS: Hastalıklı sağ, TR: Tam remisyon, Ex: Eksitius, +f:Fokal pozitif, Boş kutular: Değerlendirilemeyen