

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**EKSTRANODAL DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMA'LI HASTALARDA
BCL-2 VE MYC BİRLİKTELİĞİNİN TEDAVİ YANITI VE PROGNOZA ETKİSİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Ceren KONCA

Trabzon 2014

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**EKSTRANODAL DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMA'LI HASTALARDA
BCL-2 VE MYC BİRLİKTELİĞİNİN TEDAVİ YANITI VE PROGNOZA ETKİSİ**

Uzmanlık Tezi
Dr. Ceren KONCA

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mehmet SÖNMEZ

Trabzon 2014

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Nonhodgkin Lenfoma	2
2.1.1. Tanım	2
2.1.2. Lenfomagenez	2
2.1.3. Sınıflama	4
2.1.4. Etyopatogenez	5
2.1.5. Epidemiyoloji	6
2.1.6. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma	7
2.1.6.1. Epidemiyoloji	7
2.1.6.2. Etyoloji ve Patogenez	7
2.1.6.3. Sınıflama	8
2.1.6.4. Evreleme	12
2.1.6.5. Ekstranodal Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Klinik	12
2.1.6.6. Prognostik Faktörler	14
2.1.6.7. İmmunfenotipik Özellikleri ve Prognoza Etkileri	15
2.1.6.8. Tedavi	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. İmmunhisyokimyasal Analiz	19
3.2. Polimerize Zincir Reaksiyonu	20
3.3. İstatistiksel Yöntem	22
4. BULGULAR	23

5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇ	36
7. ÖZET	37
8. SUMMARY	39
9. KAYNAKLAR	40

TABLO LİSTESİ**Sayfa No**

Tablo 1. B hücreli neoplaziler DSÖ 2008 sınıflaması	5
Tablo 2. Lenfomalarda görülen kromozom anomalileri	6
Tablo 3. DSÖ 2008 DBBHL varyantları, altgrupları sınıflaması	9
Tablo 4. Ann Arbor evreleme sistemi	12
Tablo 5. International Prognostic Index skoru (IPI SKORU)	15
Tablo 6. Hastaların demografik özellikleri	23
Tablo 7. IPI skoruna göre hasta sayıları	24
Tablo 8. Bcl-2/Myc ekspresyon birlikteliği hasta sayıları	24
Tablo 9. PCR yönteminin spesifite ve sensitivitesi	25
Tablo 10. DHL hastalarının genel özellikleri	26
Tablo 11. DHL hastalarının genel ve progresyonsuz sağkalımı	28
Tablo 12. Myc ve Bcl-2 PCR korelasyon analizi	28
Tablo 13. GMBH / GMBH-dışı DBBHL hastalarının genel özellikleri	30
Tablo 14. GMBH / GMBH-dışı DBBHL hastalarının genel ve progresyonsuz sağkalımı	30
Tablo 15. DHL hastalarının histopatolojik gruplara göre dağılımı	31

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Hans algoritması	10
Şekil 2. İmmunhistokimyasal boyama ile Bcl-2 ekspresyonu	25
Şekil 3. İmmunhistokimyasal boyama ile Myc ekspresyonu	26
Şekil 4. DHL hastalarının genel sağkalımı	27
Şekil 5. DHL hastalarının progresyonsuz sağkalımı	28
Şekil 6. İmmunhistokimyasal boyama ile CD10 pozitif GMBH varyant	29
Şekil 7. İmmunhistokimyasal boyama ile Bcl-6 ve Mum-1 pozitif GMBH-dışı varyant	29
Şekil 8. GMBH / GMBH-dışı DBBHL hastalarının genel sağkalımı	30
Şekil 9. GMBH / GMBH-dışı DBBHL hastalarının progresyonsuz sağkalımı	31

KISALTMALAR LİSTESİ

ABH	: Aktive B Hücreli
ACVBP	: Adriamisin, Siklofosfamid, Vindesin, Bleomisin, Prednizolon
ALP	: Alkalen Fosfataz
BL	: Burkitt Lenfoma
CHOEP	: Siklofosfamid, Doksorubusin, Vinkristin, Prednizolon, Etoposit
CHOP	: Siklofosfamid, Doksorubusin, Vinkristin, Prednizolon
CODOX-M/IVAC	: Rituksimab, Siklofosfamid, Vinkristin, Doksorubusin, Metotreksat, İfosfamide, Etoposit, Sitarabin
DBBHL	: Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma
DHL	: Double Hit Lenfoma
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EBV	: Epstein Barr Virüs
ECOG	: Eastern Cooperative Oncology Group
FL	: Foliküler Lenfoma
GGT	: Gama Glutamil Transferaz
GMBH	: Germinal Merkez B Hücreli
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
HKH	: Hematopoitik kök hücre
HL	: Hodgkin Lenfoma
HTLV-1	: Human T Lymphotropic Virus
IPI	: International Prognostik İndeks
KLL/SLL	: Küçük Lenfositik Lenfoma
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
MALT	: Mucosa Associated Lenfoid Tissue
MCL	: Mantle Cell Lenfoma
MM	: Multiple Myelom

MPP	: Multipotent Progenitör
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
Mum-1/IRF-4	: Multiple Myeloma Oncogene 1/İnterferon Regulator Faktör 4
NHL	: Nonhodgkin Lenfoma
NK	: Natural Killer
REAL	: Revised European American Lymphoma Listing
R-EPOCH	: Rituksimab, Etoposit, Prednizolon, Vinkristin, Siklofosamid, Doksorubisin
R-HyperCVAD/MA	: Rituksimab, Hiperfraksiyone Siklofosamid, Vinkristin, Doksorubisin, Dekametazon, Metotreksat ve Sitarabin
R-ICE	: Rituksimab, İfosamid, Karboplatin, Etoposit
R-IPi	: Revize Edilmiş İnternational Prognostik İndeks
RT	: Radyoterapi
THL	: Triple Hit lenfoma
VKSS	: Vena Kava Süperior Sendromu

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nonhodgkin lenfoma (NHL) B, T lenfositlerden ve doğal öldürücü (NK) hücrelerden kaynaklanan, malign, klonal bir hastalıktır. Yıllarca tedavi gerektirmeksizin izlenebilen yavaş seyirli (indolent) formları ve tedavi edilmezse hızlı ilerleyebilen (agresif) türleri içeren heterojen bir hastalık grubudur. NHL'nin en yaygın alt tipini olguların yaklaşık %30-40'ında görülen diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL) oluşturmakla birlikte, bu lenfomalar da kendi içlerinde hastalığın seyrini etkileyen immünofenotipik, sitogenetik ve morfolojik farklılıklar göstermektedirler (1).

DBBHL'ler köken aldığı hücrelerin gen ekspresyon profillerine göre germinal merkez B hücreli (GMBH), aktive B hücreli (ABH) ve tip 3 olmak üzere üç farklı histopatolojik alt gruba ayrılmış olup, GMBH'li DBBHL'nin diğer gen ekspresyon profillerine göre daha iyi prognoza sahip olduğu izlenmiştir (2). DBBHL patogenezinde onkogenler ve tümör supressör genlerde meydana gelen değişikliklerin önemli rol oynadığının saptanması sonrası, hücre proliferasyonunda düzenleyici rol oynayan myc onkogeni değişimleri DBBHL'li hastalarda kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (3). Takiben myc ve bcl-2 gen ekspresyonunun birlikte olduğu, tanı anında yüksek laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyi, B semptomları varlığı ve ektranodal tutulumların sıklıkla izlendiği, DBBHL'den daha kötü prognoza sahip olan double hit lenfomalar (DHL) tanımlanmıştır (4).

Bu çalışmada, ektranodal DBBHL'li hastalarda immünohistokimyasal ve moleküler yöntemlerle saptanan DHL varlığının, tedavi yanıtına ve yaşam sürelerine etkilerinin araştırılması planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nonhodgkin Lenfoma

2.1.1. Tanım

NHL, immun sistem hücrelerinin neoplastik proliferasyonu olup kaynaklandığı hücrenin (T/B lenfosit veya NK hücreleri) farklılaşma düzeyine göre değişik morfolojik, immunolojik ve klinik özellikler gösterir (1).

2.1.2. Lenfomagenez

Hematopoietik kök hücre (HKH), yolk sacta gestasyonun 16. gününde; doğum sonrasında hematopoietik hücrelerin asıl kaynağı olan kemik iliğindeki hematopoez ise gestasyonun 5. ayında ortaya çıkmaktadır. HKH'ler önce multipotent progenitörleri (MPP) oluştururlar, takiben bazı transkripsiyon faktörlerinin (EZA ve PAX-5 gibi) ve Notch sinyalinin supresyonu varlığında B hücre farklılaşmasına yönelirler. Kemik iliğindeki diğer erken progenitörler (erken timik progenitörler), Notch sinyalini aktive eden ligandlar eksprese eden stromal hücrelerden zengin timusa göç ederler ve bu hücreler T hücre farklılaşmasına yönelirler. B lenfositlerin ilk defa kuşlarda kloaka yakınında fabrikus bursası denilen lenfoid organlarda geliştiği saptandığından bu hücreler B hücreleri olarak adlandırılmıştır (5, 6).

Normal lenfoid dokular, primer ve sekonder lenfoid organlar olarak iki gruba ayrılırlar. Primer lenfoid organlar, öncü lenfoid hücrelerin bulunduğu, antijenik uyarıya yanıt verebilecek B ve T lenfositlerin başlangıç gelişiminin gerçekleştiği kemik iliği ve timusu içerir. Lenf nodları, dalak, tonsiller, solunum yolları ve gastrointestinal kanaldaki lenfoid agregatlardan oluşan sekonder lenfoid organlarda ise antijenik uyarıyla naif lenfoid hücrelerde proliferasyon meydana gelmektedir. Sekonder lenfoid organlarda B hücreleri

çoğunlukla foliküllerde yer alırken, T lenfositler interfoliküler alanlarda bulunurlar. Lenfoid hücrelere ek olarak dendritik hücreler, histiyositler, endotelial hücreler gibi lenfoid olmayan hücreler de mikroçevrenin organizasyonuna katkı sağlayıp hücre-hücre etkileşimlerinde rol oynarlar (6).

Lenfomaların %90'ı B hücrelerden kaynaklanmaktadır. Normal koşullarda kemik iliğinde B lenfoid kök hücrelerden başlayan (progenitor B hücre) ve yine kemik iliğinde VDJ gen yeniden düzenlenmesiyle gerçekleşen bir olgunlaşma süreci mevcuttur. Daha sonra sitoplazmik mü, ağır zincir ve yüzey Ig M ekspresyonu ile karakterize pre B ve immatür B hücrelerine farklılaşma izlenir (6). İmmatür B hücreler yüzeylerinde Ig M ve Ig D eksprese eden olgun B hücrelerine dönüştükten sonra kemik iliğini terk ederler. Primer lenfoid foliküllere ve foliküllerin dış bölgelerine (mantle zone) yerleşen bu hücreler istirahat halinde olup ve yüzeylerinde CD5 eksprese etmektedirler (7).

Olgunlaşma evresi için gerekli antijenik uyarı sonucu B hücrelerinde blastik transformasyon gerçekleşmektedir. Yüzey Ig D ekspresyonunu kaybeden hücreler primer foliküllerin merkezine göç ederek antijen sunan hücrelerin (dendritik hücre) çevresinde germinal merkezleri oluştururlar. CD10 ve bcl-6 (+) olan bu hücreler yüzey immunoglobulin ekspresyonunu kaybederler, bcl-2 ekspresyonundaki azalmayla beraber apoptoza duyarlı hale gelirler. Somatik mutasyonlar sonucu farklı bir antijeni tanıma kapasitesine sahip olgun B hücreleri foliküler dendritik hücrelerin sunduğu antijenlerle etkileşime girerek yeniden bcl-2 eksprese etmeye başlarlar. Bu sayede dışarıdan gelecek olan yabancı antijenlere karşı bağışıklığın oluşması sağlanmaktadır. Germinal merkezlerde zamanla immunoglobulin sınıf değişimi olur ve Ig M; Ig A ve Ig G'ye dönüşür. Antijenik uyarı sonrası germinal merkezlerde gerçekleşen bu süreçte meydana gelen mutasyonlar ya da aksamalar bu hücrelerden foliküler lenfoma (FL), burkitt lenfoma (BL), DBBHL ve hodgkin lenfoma (HL) gibi lenfoid malignansilerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (6, 8).

B hücreler gelişimlerini; germinal merkezdeki T hücreleri ve foliküler dendritik hücrelerle etkileşim sonucu bcl-6 ekspresyonunu kaybetmeleri ve plazma hücre ya da bellek hücrelerine dönüşerek marjinal bölgeye yerleşmeleri ile tamamlarlar (6, 9).

2.1.3. Sınıflama

Lenfomalar gerek morfolojik gerekse klinik özellikleri açısından heterojen malignitelerdir. Bu heterojenite pek çok farklı sınıflama sisteminin gelişimine sebep olmuştur. NHL için 1970' li yıllardan günümüze kadar Rappaport, Lukes & Collins, Kiel, Working formulation ve REAL (Revised European American Lymphoma Listing) sınıflaması gibi birçok farklı sınıflama kullanılmıştır. Güncellenmiş Kiel sınıflaması özellikle Avrupa'da olmak üzere yaygın bir kullanım alanına sahip iken, birçok lenfoma kategorisini ortaya koymada yararlı olmasıyla birlikte, özellikle nodal lenfomalar için yapılmış bir sınıflandırma olup, ektranodal lenfomaları yansıtmamaktadır (10). 1981'den sonra 'Working Formülasyonu' büyüme paterni ve hücre boyutu değerlendirilerek yapılan kolay bir sınıflama olduğundan yaygın olarak kullanılmakta iken, kategorilerin heterojen olması ve immünofenotipin göz önüne alınmaması nedeniyle 1990 ve 2000'li yıllarda yeni sınıflama arayışına girilmiştir (10). 1994 yılında Uluslararası Lenfoma Çalışma Grubu tarafından gündeme getirilen REAL sınıflaması her lenfoma tipinin morfolojik, klinik, immünofenotipik ve genotipik özellikleri ile tek tek ayrı bir antite olarak tanımlanıp listelenmesi prensibine dayanmaktadır. REAL sınıflamasının, Working Formülasyonu ve Kiel sınıflamasından diğer önemli bir farkı da morfolojik ve/veya immünojenetik olarak ayrılamayan bazı kategorileri de tek bir kategori altında toplamasıdır (10). REAL sınıflaması 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflamasına revize edilmiş olup, DSÖ sınıflaması 2008 yılında güncellenmiştir ve günümüzde halen geçerliliğini korumaktadır (11).

DSÖ sınıflamasında lenfomalar B hücreli, T/NK hücreli ve HL olmak üzere üç ana başlık altında toplanmış ve alt gruplara ayrılmıştır (Tablo 1). Ancak bu sınıflama içerdiği birçok alt grup nedeniyle oldukça karmaşık olup klinik kullanımı güçtür. Bu nedenle günlük pratikte NHL'ler klinik özellik ve tedavi yaklaşımlarına göre indolent (yavaş seyirli) veya agresif/çok agresif (hızlı seyirli) olmak üzere 2 ana gruba ayırarak takip edilmektedir.

Tablo 1. B Hücreli Neoplaziler DSÖ 2008 sınıflaması

Öncül B Hücreli Lenfoblastik Lösemi / Lenfoma
Matür B Hücreli Neoplazmlar: Kronik Lenfositik Lösemi / Küçük Lenfositik Lenfoma
B Hücreli Prolenfositik Lösemi
Splenik Marjinal Zon Lenfoma
Hairy Cell Lösemi (Tüylü Hücreli Lösemi)
Splenik Lösemi/Lenfoma, Sınıflandırılmayan
Lenfoplasmositik Lenfoma
Ağır Zincir Hastalığı
Plazma Hücreli Neoplazi
Mukoza İlişkili Ekstranodal Marjinal Zon Lenfoması (MALT Tipi)
Nodal Marjinal Zon Lenfoma
Foliküler Lenfoma
Primer Kutanöz Follikül Merkezli Lenfoma
Mantle Hücreli Lenfoma
Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma
Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma, Başka Türü Sınıflandırılmayan
Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma, Alt Grupları
Diğer Büyük B Hücreli Neoplaziler
Burkitt Lenfoma
Borderline Olgular

2.1.4. Etyopatogenez

Lenfomaların etyolojisi tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte etyopatogenezinde enfeksiyonlar, kimyasal ajanlar, genetik bozukluklar, immün yetmezlikler gibi çeşitli faktörler suçlanmaktadır (12). Ayrıca, kronik inflamatuvar hastalıklarda da (Sjögren Sendromu, Çölyak Hastalığı, Romatoid Artrit gibi) NHL gelişim riski artmaktadır (13). Enfeksiyon ajanları ile birlikteliği gösterilen çeşitli NHL tipleri mevcuttur. Helikobakter Pylori ile MALT lenfoma, Epstein-Barr Virus (EBV) ile BL, Hepatit C virüsü ile splenik ya da büyük hücreli lenfoma, Chlamidia Psittaci ile oküler-adneksial lenfoma gelişiminin arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca Human İmmunodeficiency Virus (HIV) pozitif hastalarda primer merkezi sinir sistemi lenfomaları (MSS) izlenirken, oral kavitede görülen plazmoblastik lenfomalı hastaların bir kısmında da EBV saptanmıştır (13-15). İlaça bağlı immünsüpresyon, solid organ transplantasyonu veya HIV enfeksiyonu sonucu gelişen immünyetmezlik durumlarında artmış NHL gelişim riski ile birliktedir (16, 17).

NHL olgularının önemli bir kısmında çeşitli kromozomal translokasyonlar mevcuttur. Bu translokasyonlar moleküler düzeyde onkogen aktivasyonu veya tümör süpresör gen inaktivasyonunu hızlandırarak hastalığa zemin hazırlamaktadırlar (Tablo 2). t(14;18)(q32;q21) NHL'ye en sık eşlik eden kromozomal anomalisi olup, FL'de %85, DBBHL'de %28 oranında bulunmaktadır (18-20). Translokasyon sonucu 18. kromozomdaki bcl-2 geni, kromozom 14 deki immünoglobulin ağır zincir loküsü ile yan yana gelmekte ve sonuç olarak apoptozise karşı hücrel direnç gelişmektedir (13). Bcl-6 veya c-myc'yi içeren moleküler yeniden düzenlenmeler sıklıkla DBBHL'de ve BL'de görülmektedir. Ancak diğer malignitelerde olduğu gibi lenfositlerin malign transformasyonu için de genetik anormalliklerin birikimi gerekmektedir (21).

Tablo 2. Lenfomalarda görülen kromozom anomalileri

t (11,14)	Mantle Hücreli Lenfoma Plazma Hücreli Myelom
t (14,18)	Foliküler Lenfoma
t (8,14)	Burkitt Lenfoma
t (9,14)	Lenfoplazmositik Lenfoma
t (11,18), t (1,4), t (14,18)	Malt Lenfoma
t (2,5)	Anaplastik Büyük Hücreli Lenfoma
t (11,18)	Ekstranodal Düşük Dereceli MALT Lenfoma
t (1,4)	Ekstranodal MALT Lenfoma
Del 7	Splenik Marjinal Zon Lenfoma
İzokromozom 7q	Hepatosplenik T Hücreli Lenfoma

2.1.5. Epidemiyoloji

Tüm kanserlerin yaklaşık %3'ünü oluşturan lenfomalar hematolojik maligniteler arasında en sık görülenidir. Ülkemizde HL toplam lenfoma hastalarının yaklaşık %20'sini, NHL ise %80'ini oluşturmaktadır. 2008 Sağlık Bakanlığı verilerine bakıldığında NHL'ler en sık görülmekte olan maligniteler arasında erkeklerde 7. ve kadınlarda 8. sırada yer almaktadır (22). NHL genel olarak 55 yaş ve üzeri erişkinlerin hastalığıdır. Ülkemizde batı ülkeleri ile kıyaslandığında 10 yaş kadar daha genç yaşta rastlanabilmektedir. Görülme sıklığı erkeklerde kadınlardan daha fazladır (E/K: 2.1-1.2) (23, 24). NHL'lerin histolojik

alt tip dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermekle birlikte dünyada en sık görülen histolojik alt tip DBBHL' dir (25).

2.1.6. Diffüz Büyük B Hücreli Non-Hodgkin Lenfoma

Erişkinlerde en sık görülen lenfoid malignite olan DBBHL morfolojik, immünolojik ve sitogenetik özellikler açısından belirgin biyolojik heterojenite göstermektedir. DBBHL agresif seyir göstermesine rağmen tedavi yanıtları iyi olup kür şansı olan bir malignitedir. Uzun süreli takiplerde, hastaların %75-80'inde tam remisyona görülebilirken hastalısız hayatta kalma oranı yaklaşık %50 olarak belirtilmektedir (1, 26). Çocuklar dahil her yaş grubu ve her iki cinsiyette görülebilmekle beraber orta-ileri yaş grubunda ve erkeklerde kadınlara nazaran daha sık rastlanmaktadır (27, 28).

DBBHL lenf nodu ve/veya ektranodal yapılarda gelişebilmektedir. Ektranodal tutulum yeni tanı alan hastaların %40' ına yakınında rastlanmaktadır. Sıklıkla gastrointestinal bölge, cilt, kemik iliği, paranazal sinüsler, tiroid, MSS, karaciğer ve dalak tutulumları izlenmektedir (29, 30). İlk başvuru sırasında kemik iliği ve/veya çevre kanı tutulumu daha nadirdir (31). DBBHL genellikle de-novo olarak başlamasına rağmen FL, küçük lenfositik lenfoma (KLL/SLL) ve mantle cell lenfoma (MCL)'da olduğu gibi düşük dereceli NHL'lerin transformasyonu sonucu da gelişebilmektedir (27).

2.1.6.1. Epidemiyoloji

DBBHL tüm lenfoid malignitelerin %30'unu, NHL'nin ise %30-40'ını oluşturmaktadır (27-29). Görülme sıklığı 2.9/100.000/yıl olup, sıklığı yaşla birlikte artmakta ve erkeklerde daha sık görülmektedir (30).

2.1.6.2. Etyoloji ve Patogenez

Diğer lenfomalara benzer şekilde çevresel etkenler (endüstriyel toksinler, tarım ilaçları, radyasyon, kemoterapötikler vb.), infeksiyöz ajanlar (HIV, HTLV-1, EBV, Helikobakter Pylori vb.), bağışıklığın baskılanmasına neden olan durumlar (otoimmün hastalıklar, transplantasyon ve tedavileri vb.) ve bazı kromozomal anomalileri etyolojide sorumlu tutulmaktadır (32).

DBBHL’de başta bcl-6, bcl-2 ve myc gibi genlerin ekspresyonu etkileyen translokasyonlara; 6q, 17q, 8p, 1p, 9p ve 22q kaybı veya Xq, 3q, 7, 12q, 13q, 18q kazanılması şeklinde DNA dengesizlikleri gibi sitogenetik anormalliklere; terminal B hücre farklılaşması için gerekli olan transkripsiyon baskılayıcısı olan BLIMP1 mutasyonu gibi genetik mutasyonlarla çeşitli sıklıklarda karşılaşılmaktadır (33, 34). DNA metilasyonunu bozan bazı polimorfizmler protoonkogen ve tümör süpresör genlerin hipo veya hipermetilasyonuna yol açarak hastalık gelişimine yatkınlık oluşturabilmektedirler. Yine oksidatif stres genleri de reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerinden hücrelerin korunabilme yeteneğini etkileyip DBBHL patogenezinde etkili olabilmektedir (35).

2.1.6.3. Sınıflaması

DSÖ 2008 sınıflamasında DBBHL’ler için histomorfolojik, immunhistokimyasal ve moleküler temellere dayanılarak farklı varyantlar tanımlanmıştır.

Morfolojik varyant olarak tanımlanan grup; sentroblastik, immunoblastik ve anaplastik gibi sık görülen varyantları ile miksoid stroma, fibriler matriks içeren iğsi görünümde veya taşlı yüzük benzeri morfolojide olan ancak daha nadir görülen varyantları içerir (1, 36). Sentroblastik varyant bu grup içerisinde en sık görülenidir. Bazı olgularda tümör monomorfik olup %90’dan fazla sentroblast içerirken, bazıları sentroblast ve immunoblastları beraber içerecek şekilde polimorfik özellik gösterirler. İmmunoblastik varyant ise %90’dan fazlası immunoblastlardan oluşan en kötü prognozlu DBBHL morfolojik varyantıdır. Sıklıkla Hashimoto tiroiditi, Sjögren hastalığı, Lupus eritematozus gibi immun aracılı hastalıklarda görülmektedir. Anaplastik varyant en nadir görülen varyant olup Hodgkin ve/veya Reed- Sternberg hücresi ya da anaplastik büyük hücreli lenfoma hücrelerine benzer özellikte tümör hücrelerinden oluşmaktadır (37), (Tablo 3).

Tablo 3. DSÖ 2008 DBBHL varyantları, altgrupları sınıflaması

Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma, Başka Türü Sınıflandırılmayan

Morfolojik varyantlar:

Sık Görülen Morfolojik Varyantlar

Sentroblastik

İmmunoblastik

Anaplastik

Nadir görülen morfolojik varyantlar

Moleküler Alt Gruplar:

GMB Hücre Kökenli

AB Hücre Kökenli

İmmunohistokimyasal Alt Gruplar:

CD5 Pozitif DBBHL

GMBH Kökenli

GMBH-dışı Kökenli

Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma, Altgrupları:

T-Hücre/Histiositten Zengin Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma

Santral Sinir Sisteminin Primer Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoması

Primer Kutanöz Bacak Tipi DBBHL Yaşlılığın EBV Pozitif DBBHL

Diğer Büyük B Hücreli Neoplaziler:

Primer Mediastinal (Timik) Büyük B-Hücreli Lenfoma

İntravasküler Büyük B-Hücreli Lenfoma

Kronik İnflamasyonla İlişkili DBBHL

Lenfomatoid Granulomatozis

ALK Pozitif Büyük B- Hücreli Lenfoma

Plazmoblastik Lenfoma HHV-8 İlişkili Castleman Hastalığı Zemininde Gelişen

DBBHL Primer Efüzyon Lenfoması

Borderline Vakalar:

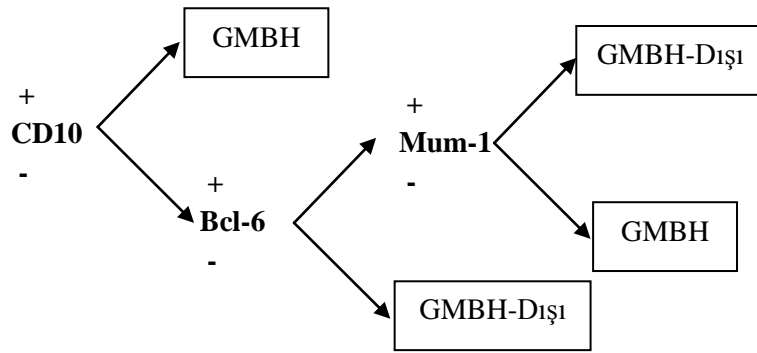
DBBHL ve BL Özellikleri Arasında Kalan Başka Türü Sınıflandırılmayan B-Hücreli Lenfoma

DBBHL ve Klasik HL Özellikleri Arasında Kalan Başka Türü Sınıflandırılmayan B-Hücreli Lenfoma

Moleküler alt grupları tanımlamada ise cDNA ve oligonükleotid mikroarrayleri kullanarak yapılan çalışmalarda, önemli biyolojik altgruplar belirlenmiştir. Buna göre GMBH, ABH ve tip 3 gen ekspresyon profil tipleri tanımlanmıştır (1-3). GMBH’li DBBHL, farklılaşmanın germinal merkez evresindeki B hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Germinal merkez evresi, B hücrelerinin hızlı proliferasyonu, immunglobulin reseptörlerinin mutasyonu, antijene yüksek afiniteyle bağlanma yeteneğine göre pozitif seleksiyon ve apoptoz ile eliminasyonun gerçekleştiği dönemdir. GMBH’li DBBHL’de tümör hücreleri GMBH belirteçlerinin çoğunu içerir ve klinik dahil prognostik

parametreler göz önünde bulundurulduğunda diğer iki gruba göre daha iyi prognoza sahiptir. ABH'li DBBHL, B hücre farklılaşmasının germinal merkez ile plazma hücre evresi arasındaki B hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Bu gruptaki hastaların büyük çoğunluğunu 60 yaş üzerinde ve performans durumları kötü hastalar oluşturmaktadır. Tip 3 gen ekspresyon profili tam aydınlatılmamış olmakla birlikte sonlanım açısından ABH subgrupuna benzemektedir (1-3). ABH'li DBBHL tipinde hücrelerin canlılığında ve proliferasyonunda NFκB yolağın aktivasyonunun öneminin anlaşılması gen ekspresyon profili çalışmalarının potansiyel terapötik hedeflerin belirlenmesinde görev alabileceğini düşündürmüştü, fakat gen ekspresyon teknolojisi taze ya da frozen doku RNA'ları ile yapılabildiğinden ve pahalı bir teknoloji olduğundan rutin kullanıma girememiştir.

İmmunohistokimyasal boyama yöntemi ile tanımlanan altgrupların belirlenmesi için CD10, Bcl-6, Mum-1/IRF-4 boyamaları kombine olarak kullanılmaktadır. Boyama yöntemleri ile hastaların GMBH'li DBBHL ve GMBH-dışı DBBHL olarak sınıflandırılmasını sağlayan bir algoritma oluşturulmuştur (Şekil 1), (1-3). Hans CP ve arkadaşları tarafından yapılan bu algoritma ile elde edilen sonuçlar gen ekspresyon çalışmalarıyla %80 uyumlu bulunmuştur (38).



Şekil 1. Hans algoritması

- Hans Algoritmasında Kullanılan Antijenler

CD10: Akut lenfoblastik lösemi antijeni (CALLA) ya da neprilysin olarak da bilinen 100 kDa ağırlığında çinko bağımlı bir metaloproteazdır. Glukagon, enkefalin, oksitosin, bradikinin, substans P gibi çeşitli peptid hormonları inaktive edebilme yeteneğine sahiptir. Normal, neoplastik lenfoid ve nonlenfoid dokularda eksprese edilmektedir. Normal lenfoid diferansiyasyon sırasında ilk defa pro-B hücrelerinde görünür ve naive-B hücrelerine matürasyon esnasında kaybolur. Antijen bağımlı germinal merkez

matürasyonu sırasında tekrar hücre yüzeyinde ortaya çıkar ve bu nedenle germinal merkez orjinini gösteren bir belirteçtir. Prekürsör B hücreli akut lenfoblastik lösemilerin yaklaşık %75'inde, FL ve BL'lerin büyük çoğunluğunda ve denovo DBBHL'ların %20-30'unda eksprese edilmektedir (6, 45).

Bcl-6: Kromozom 8q27 üzerinde bulunan bcl-6 geni yaklaşık 24 kb uzunluğundadır ve 95 kDa'lık bir proteini kodlar. Bcl-6 proteini, N terminal ucunda BTB/poz bölgesi ile C terminal 6 zinc-finger DNA bağlayıcı motifin varlığıyla karakterize, DNA'ya bağlanarak ve ko-represörlerin yardımıyla germinal merkez B hücrelerinin matürasyonunda fonksiyon gören bir transkripsiyonel inhibitördür. Germinal merkez B hücrelerinde eksprese edilen bcl-6'nın ayrıca CD4+ T helper hücrelerin gelişimiyle de ilişkili olduğu saptanmıştır. Normal B hücre gelişimi sırasında bcl-6 tarafından gerçekleştirilen kritik fonksiyonlar malign transformasyon sürecinde değişebilir ve bcl-6, germinal merkez kaynaklı lenfomalarda bir onkogen olarak davranır. Bcl-6 gen yeniden düzenlenmeleri FL hastalarında %5-10 oranında saptanırken DBBHL olgularının yaklaşık %40'ında mevcuttur (46).

Mum-1/IRF-4 (Multiple myeloma oncogene 1/interferon regulatuar faktör 4): Mum-1 geni ilk defa t(6;14) (p25;q32) içeren bir multiple myelom (MM) hücre dizisinde kromozomal kırık bölgesinin klonlanmasıyla belirlenmiş, immunglobulin ağır zincir lokusuna jukstapozisyondaki bir genidir. IRF ailesinin üyesi ve lenfoid hücre gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülen bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Normal dokuda Mum-1/IRF-4 proteini temel olarak plazma hücreleri ile germinal merkez hücrelerinin bcl-6 negatif, non-proliferatif (Ki67 negatif) küçük bir bölümünde pozitifdir. Ayrıca T hücrelerinin küçük bir bölümü ve CD30 pozitif perifoliküler hücrelerin büyük çoğunluğunda da pozitif saptanır. Mum-1/IRF-4 lenfoplazmasitik lenfoma/immunositomada güçlü şekilde eksprese edilirken, DBBHL, primer efüzyon lenfoma, MM'de yaklaşık %75 oranında eksprese edilir (46).

Myc ile Bcl-2 birlikteliği Double-Hit Lenfoma (DHL) olarak isimlendirilerek, DBBHL ve BL arasında B hücreli lenfomalar olarak tanımlanmıştır. DHL'lerde daha nadir olmakla birlikte myc ile birlikte bcl-6 pozitifliği veya siklin D1 pozitifliğide izlenmektedir. Myc, bcl-2 ve bcl-6 birlikteliği ise Triple hit lenfomalar (THL) olarak adlandırılmaktadır (39-42).

Diğer DBBHL alt tipleri arasında ise T hücre /histiositten zengin DBBHL, MSS'nin primer DBBHL'sı, primer kutanöz DBHHL, bacak tipi DBBHL, yaşlılığın EBV pozitif

DBBHL'sı yer almaktadır. Özel bir alt tipe veya hastalığa ait olmayanlar ise; DBBHL, başka türlü adlandırılmayan grup adı altında toplanmıştır (1, 43).

2.1.6.4. Evreleme

1971'de HL için geliştirilen Ann Arbor evreleme sistemi kullanımı bu konudaki ilk evreleme yaklaşımıdır (44). Bu evreleme sisteminde tümörün yerleşim yeri, sayısı ve sistemik semptomların varlığı dikkate alınmıştır. Hastalığın yaygınlık derecesine göre hastalar erken evre (evre I-II) ve ileri evre (evre III-IV) olarak değerlendirilmişlerdir (Tablo 4). Evreleme sırasında hastaların detaylı fizik muayenelerinin yapılması; laboratuvar tetkiklerinin ve hastaların Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performansının değerlendirilmesi, kemik iliği biyopsisi yapılması, alınan doku örneklemeğinde prognoz hakkında ön bilgi edinme amaçlı bcl-2/myc birlikteliğinin değerlendirilmesi, MSS tutulumu açısından lumbal ponksiyon ve MR ve/veya PET/BT tetkikleri gerekmektedir.

Tablo 4. Ann Arbor evreleme sistemi

Evre I Bir lenf nodu bölgesinde veya lenfoid yapıda tutulum
Evre II Diafragmanın aynı tarafında iki ya da daha fazla lenf nodu bölgesi tutulumu
Evre III Diafragmanın her iki tarafında lenf nodu bölgesi tutulumu
III 1 Subdiyafragmatik tutulum dalak, halak hilus, çölyak veya portal nodlarla sınırlı
III 2 Subdiyafragmatik tutulum III 1 deki tutulumla ilave paraaortik, iliak veya mezenterik nod tutulumu
Evre IV Lenf nodu bölgesi tutulumu eşlik etsin ya da etmesin bir veya daha fazla, diffüz veya yaygın ektranodal organ veya bölge tutulumu
A Semptom yok
B Evreleme işlemi öncesi 6 ayda vücut ağırlığının %10'undan fazla kilo kaybı
Açıklanamayan devamlı ve tekrarlayıcı > 38C ateş, Gece terlemesi
E Kemik iliği ve karaciğer hariç, ekstralatenfatik dokunun tutulumu
S Dalak tutulumu
Kitleli (bulky) hastalık: En büyük çapı 10 cm'nin üzerinde olan kitle varlığı veya ön-arka akciğer grafisinde torakal 5-6 intervertebral disk düzeyinde hesaplanan en uzun transvers transtorasik çapın 1/3'ünü aşan mediastinal kitle mevcudiyeti

2.1.6.5. Ektranodal Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Klinik

NHL'lerin en sık görülen alt tipi olan DBBHL'de diğer NHL alt tiplerine göre ektranodal tutulum daha sık görülmektedir (27, 29) Ektranodal tutulumda olarak en sık

gastrointestinal sistem etkilenmekte olup, testis, tiroid, tükürük bezleri, tonsiller, deri, karaciğer, meme, nazal kavite, paranasal sinus ve MSS diğer sık etkilenen organlar arasındadır (13, 27, 47). Ekstranodal tutulumun yaklaşık %20–30'unu oluşturan gastrointestinal tutulumda genellikle bulantı, kusma, karın ağrısı ve dispepsi gibi spesifik olmayan semptomlar görülmektedir. Gastrointestinal tutulumda en sık tutulum yeri midedir, bunu sırasıyla ince barsak ve kalın barsaklar izlemektedir (27). DBBHL'de primer karaciğer tutulumu oldukça nadirdir. Karaciğer tutulumunda olgularda genelde tek veya multiple kitle görünümü izlenir, diffüz infiltrasyon ve tutuluma bağlı karaciğer yetersizliği ise oldukça nadir olarak görülmektedir (47). Karaciğer tutulumunda sıklıkla infiltrasyona bağlı serum alkalin fosfataz (ALP) ve gamma glutamil transpeptidaz (GGT) artışı görülmekle birlikte belirgin transaminaz artışı izlenmez. Paranasal sinüs tutulumu sık rastlanan ekstranodal tutulum alanlarından biridir. Frontal, maksiller, etmoid sinüs tutulumuna da rastlanabilir ve klinikte ağrı, yüzde şişlik, epistaksis, solunum yolu obstrüksiyonu ve rinoreye yol açabilirler. Paranasal sinüs tutulumu olan olgularda MSS yayılımı daha sık görülmektedir (48). Baş ağrısı, konfüzyon, hemiparezi, nöbetler ve kafa çifti tutulumu hastalığın nörolojik bulgularını oluşturmaktadır. MSS tutulumu özellikle AIDS ve organ nakli nedeniyle immünsupresif tedavi alan bağışıklığı baskılanmış kişilerde görülmektedir. Nazofarengeal, testiküler ve intraoküler tutulum ve yaygın kemik iliği tutulumu olan olgularda MSS tutulum riski de artmaktadır (13, 49, 50, 51). Cilt tutulumu en çok primer kutanöz T-hücreli NHL'de görülürken B-hücreli NHL'lerin de %20 kadarında gözlenmektedir ve tutulan bölgede nodül oluşumu tipiktir (52). Bulanık görme, görme kaybı gibi belirtiler gösteren intraoküler tutulum ile birlikte ekstraoküler tutulum olarak göz kapağı, konjonktiva, derin lakrimal bezler ve retrobulber bölgenin tutulumu da görülebilmektedir (53). Daha az rastlanan diğer belirtiler hastalığın olağan dışı yerleşimlerine bağlıdır. Kemik ağrısı kemik iliği tutulumu olmaksızın kemiklerin tutulduğu primer kemik lenfomasında sık görülmektedir (54). Genito-üriner tutulum üreter tıkanıklığı, renal-testiküler-ovaryal kitleler şeklinde görülebilmektedir. Meme tutulumu oldukça nadir olup, yaşlı kadınlarda ise genelde tek taraflı kitle şeklinde görülür (55). Akciğer tutulumunda nefes darlığı, göğüs ağrısı, öksürük gibi şikayetler saptanır ve %5 oranında vena kava superior sendromu (VKSS) gelişebilmektedir (56). Aritmi, kalp bloğu, kalp yetmezliği ve perikardiyal efüzyon ile kendini gösteren kalp tutulumu oldukça nadirdir ve daha çok bağışıklığı baskılanmış hastalarda görülmektedir (57). Lenfomalar bazen metabolik ve endokrinolojik belirtilere de neden olabilmekte, hiperkalsemi, hiper

veya hipoglisemi, uygunsuz ADH sendromu ve çeşitli elektrolit dengesizliklerine yol açabilmektedir.

2.1.6.6. Prognostik Faktörler

NHL'lerde prognozu etkileyebilecek klinik, laboratuvar, biyolojik ve genetik birçok faktör tanımlanmış ve 1993 yılında prognozu değerlendirmede farklı klinikopatolojik ve laboratuvar parametrelerinin multivaryant analizi kullanılarak International Prognostic Index (IPI) olarak belirtilmiş uluslararası bir skorlama sistemi önerilmiştir. Bu skorlama sistemi günümüzde klinisyenler tarafından en yaygın olarak kullanılan sistemlerdendir. IPI skoru; yaş, serum LDH düzeyi, ECOG performans durumu, Ann Arbor evresi ve ektranodal tutulum varlığı kriterlerine göre değerlendirilmektedir. Her bir faktör 0 veya 1 puan ile değerlendirilmekte olup 0-1 puan arası düşük risk, 2 puan düşük-orta risk, 3 puan orta-yüksek risk ve 4-5 puan yüksek risk grubu olarak tanımlanmaktadır (Tablo 5). Revize edilmiş IPI skorlamasında (R-IPI) ise sadece prognostik gruplar farklılık göstermektedir. R-IPI skorlamasına göre risk skoru 0 olan hastalar çok iyi; 1 ve 2 olanlar iyi; 3,4 ve 5 olanlar ise kötü prognostik grup olarak sınıflandırılmışlardır. Çok iyi prognostik gruptaki hastalarda uzun dönem progresyonsuz sağkalım %90 oranında görülmekte olup, R-CHOP (Rituksimab, Siklofosamid, Vinkristin, Doksorubisin, Prednizolon) tedavisi ile yüksek sağkalım oranlarına sahiptirler. Skorlama sistemleri dışında, Ann Arbor evresine göre ileri evre hastalık mevcudiyeti, yüksek proliferasyon indeksi, bcl-2 ekspresyonunun varlığı, immunoblastik ve plazmoblastik morfoloji, p53 overekspresyonu, bcl-6 gen yeniden düzenlenmesinin yokluğu, GMBH-dışı kökenli olması (2), ABH benzeri ekspresyonun varlığı, eşlik eden kemik iliği tutulumu olması, myc yeniden düzenlenmesinin varlığı kötü prognostik faktör olarak saptanmıştır (3, 43, 58).

Tablo 5. International Prognostic Index Skoru (IPI SKORU)

Prognostik Faktörler (Herbiri 1 Puan)
Yaş >60
Serum LDH Yüksekliği
Düşük ECOG Performans Statusu
Yüksek Evre(III-IV)
>1 Ekstranodal Tutulum
Risk Grubu (Standart IPI): 0-1: Düşük Risk
2 : Düşük-Orta Risk
3 : Orta-Yüksek Risk
4-5:Yüksek Risk
Risk Grubu (R- IPI): 0: Çok İyi
1-2: İyi;
3-4-5: Kötü

2.1.6.7. İmmunfenotipik Özellikleri ve Prognoza Etkileri

DBBHL'ler immunofenotipik olarak CD19, CD20, CD22, BSAP/PAX5 ve CD79a gibi B hücre belirleyicilerini ve %75 oranında yüzey immunglobulinlerini eksprese etmektedirler (21, 58). Bazı vakalarda bu antijenlerin bir ya da birden fazlası saptanamayabilir. Özellikle tekrarlayan lenfoması olan veya Rituximab (anti- CD20 antikoru) tedavisi alan hastalarda CD20 ekspresyon kaybı görülebilmektedir. DBBHL'nın özellikle nadir görülen anaplastik varyantında ise CD30 ekspresyonu izlenmektedir (21). CD10 yaklaşık %30-50 olguda, bcl-6 ekspresyonu %60-90 olguda, CD5 ekspresyonu %10 olguda görülebilir (21). Bcl-2 vakaların %75'inde eksprese edilirken, CD138 ekspresyonu oldukça nadirdir (21, 59). Normalde T hücrelerinde ve miyeloid kökenli hücrelerde eksprese edilen CD43 ekspresyonu DBBHL'de yaklaşık %20 – 40 arasında saptanırken, MCL'den transforme vakalarda bcl-1 ekspresyonu, KLL/SLL'den transforme vakalarda ise CD23 ekspresyonu izlenmektedir (60, 61).

DBBHL'de çeşitli genetik anormallikler ve translokasyon, delesyon, duplikasyon ve diğer tanımlanmamış karyotip anormallikleri ile karşılaşılabilir (58, 62). Bu anormallikler hastalığın gelişimi ve prognozunu etkileyebilmektedir. Kromozom translokasyonları vakaların yaklaşık %50' sinde, kromozom dengesizlikleri ise yaklaşık %70'inde görülmektedir. En sık karşılaşılan anormallikler ise bcl-6, bcl-2 ve myc gen ekspresyonunda artış ile birlikte (58).

CD10 ve bcl-6 GMBH'li DBBHL ile ilişkili olup iyi prognoz göstergesi iken, IRF-4/Mum-1 ekspresyonu ABH'li DBBHL ile ilişkili olup kötü prognozun göstergesidir (13, 38).

Bcl-6 geni 3. kromozomda yer almakta germinal merkez hücrelerinde eksprese edilmekte ve germinal merkez hücrelerinin reaksiyonunda önemli rol oynamaktadır. DBBHL' de aşırı ekspresyonu matürasyon duraklaması ve proliferasyona yol açmaktadır. (21, 63). Bcl-2 geni ise 18. kromozomda yer alan apoptoza engel olarak B hücre sağ kalımını sağlayan bir protoonkogendir ve kemoterapi direnci ile ilişkilidir. Normalde bcl-2 ekspresyonu apoptozun B hücre negatif seleksiyonunda önemli rol oynamaktadır. DBBHL'de bcl-2 ekspresyonunda artış olması olumsuz prognozu gösterir (21, 63). Bcl-2 deregulasyonu, DBBHL vakalarının yaklaşık %28'inde t(14;18) ile birliktedir. Ancak, DBBHL vakaların yaklaşık %50' sinde t(14;18)'den bağımsız bcl-2 aşırı ekspresyonu saptanabilmektedir (13). Myc; 62-kDa ağırlığında, hücre siklusu progresyonunu sağlayacak bazı genleri aktive ederken (Siklin D1, D2 ve CDK4 gibi) aynı zamanda bazı inhibitör proteinleri (p21CIP1 ve p27KIP1) de inhibe eden, farklı yollardan apoptozisi aktive eden bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. BL'de görülmekle beraber DBBHL olgularının yaklaşık %15' inde bulunmaktadır. Genelde t(8;14) varlığında izlenmektedir (21). Myc yeniden düzenlenmesi daha sık olarak ekstrasnodal tutulumlu DBBHL veya HIV pozitif hastalarda görülmektedir ve genellikle agresif klinik gidiş ile ilişkili bulunmaktadır.

Bcl-2 ve myc birlikteliğinin olduğu DHL' ler agresif tümörler olup, tanı anında genellikle ileri evrededirler. Kemik iliği, periferik kan ve MSS tutulumunun sık olarak gözlemlendiği bu lenfoma alt tipinin agresif davranışı tümörlerin proliferatif (myc) ve anti-apoptotik (bcl-2) onkoproteinleri aynı anda eksprese etmesi ile açıklanabilmektedir (4).

Tümör süpresör gen olan p53 mutasyonu DBBHL' de sık görülmemekle beraber varlığı kötü prognozu göstermektedir (21). DBBHL hücrelerinde interferon ve diğer sitokin sinyaline yanıt olarak gen ekspresyonu regülasyonunda önemli rol oynayan Mum-1/IRF-4 ekspresyonu siktir olarak saptanmaktadır (%51-75). Normalde B hücre farklılaşmasının son aşamasında eksprese olan Mum-1/IRF-4 immünoblastik varyant ve primer nodal prezentasyon ile ilişkilidir (21).

DBBHL'de prognozu etkileyebilen çok sayıda kromozom dengesizliği tanımlanmıştır; 1q, 5, 7q 12, 14. kromozom dengesizlikleri kötü prognozla ilişkili iken, 3p iyi prognoz ile ilişkilidir. Xq, 7q, 12 p, 6, 9 gibi kromozomal dengesizlikler ise prognoz üzerine anlamlı etkiye sahip değildirler (62). Yüksek çoğalma hızını belirlemede kullanılan

Ki 67 antijeninin yüksek bulunması (>%60), DBBHL olgularında sağkalımı kısaltan faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (64). Ayrıca malign tümör hücrelerinde immün tanıma mekanizmalarının kaybı (HLA-DR) tümör hücresine karşı süpresör ve sitotoksik T lenfosit yanıtını bozmakta, malign hücrenin immün sistemin koruyucu mekanizmasından kaçışına olanak sağlamakta ve bu özellik prognoza da olumsuz yansımaktadır.

2.1.6.8. Tedavi

Lenfoma tedavisinde 1894 yıllarında Fowler solusyonu, 1943’de nitrojen mustard, 1949’da kortikosteroidler ve folik asit antagonistleri kullanılmıştır. 1963 yılında vinkristin keşfi ile kombine olarak vinkristin, nitrojen mustard, metotreksat ve prednizolon gibi ajanlar denenmiş, 1976 yılında ise ilk kez kombine olarak CHOP kemoterapi protokolü uygulamaya girmiş ve sonrasında standart tedavi rejimi olarak kullanılmaya başlanmıştır (65). Ancak hastaların %30’unda CHOP tedavisine refrakterlik ve tedavi bitiminden kısa bir süre sonra relaps gözleendiğinden, yeni tedavi gerekliliği doğmuş ve doz yoğunluğu artırılmış modifiye CHOP rejimleri denenmeye başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda CHOP modifikasyonu olan ACVBP’nin (Adriamisin, Siklofosfamid, Vindesin, Bleomisin, Prednizolon) CHOP rejimine üstün olduğu gösterilmiş ancak bu tedavi ile hematolojik toksisitenin de arttığı saptanmıştır (42). Alman High Grade Non-Hodgkin Lenfoma Grubu (DSHNHL) ise CHOEP (CHOP +Etoposit) rejiminin LDH düzeyi normal olan hastalarda CHOP rejimine üstün olduğunu göstermişlerdir (66). Tedaviye CD20’ye karşı geliştirilmiş kimerik bir monoklonal antikor olan Rituksimab ilavesi ile tedavi yanıtları ve sağkalım oranlarının arttığı gösterilmesi sonrasında 3 kür R-CHOP + tutulu alana radyoterapi (RT); risk faktörü ve bulky hastalığı olan hastalarda ise 6-8 kür R-CHOP ± tutulu alan RT altın standart tedavi olarak kullanılmaktadır (67-69).

Testis tutulumu olan hastalarda diğer testis ve MSS metastazı sık olduğundan MSS profilaksisi ile skrotal RT gerekmektedir. MSS tutulumu olan hastalarda ise R-CHOP tedavisi beyin dokusuna geçişte yetersiz kalacağından yüksek doz metotreksat içeren tedavilerin kullanılması gerekmektedir (70).

Nüks veya refrakter DBBHL hastalarına, büyük ölçüde proliferatif olan DBBHL ile BL özelliklerine sahip lenfomalara, DHL’lere ve myc pozitif varyantlara R-CHOP ile başarısızlık oranı yüksek olduğu için; R-Hyper CVAD/MA (Ritüksimab, Hiperfraksiyone Siklofosfamid, Vinkristin, Doksorubusin, Deksetazon, Metotreksat ve Sitarabin), R-ICE

(Rituksimab, İfosfamid, Karboplatin, Etoposit), R-EPOCH (Rituksimab, Etoposit, Prednizolon, Vinkristin, Siklofosfamid, Doksorubusin), CODOX-M/IVAC (Rituksimab, Siklofosfamid, Vinkristin, Doksorubusin, Metotreksat, İfosfamid, Etoposit, Sitarabin) gibi kemoterapi rejimleri kullanılabilir. Yine bu hasta gruplarına otolog kök hücre transplantasyonunun faydalı olacağı kanıtlanmıştır (70).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim dalında 2008-2013 yılları arasında ektranodal DBBHL tanısı alan 31 hasta çalışmaya alındı. Düşük dereceli B hücreli lenfomadan transforme olan ve HIV pozitif olan olgular çalışmaya dahil edilmedi. Hasta izleminde kullanılan dosyalar retrospektif olarak incelendi ve hastaların tanı yaşı, cinsiyeti, ektranodal tutulum alanları, hastalık evresi, risk grubu, histopatolojik tanısı, IPI skorları, tanı anındaki LDH düzeyleri, kemik iliği tutulumu ve B semptomları varlığı, almış oldukları tedaviler saptanarak progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalım süreleri belirlendi. Tüm hastaların patolojik dokularında immünohistokimyasal olarak bcl-6, bcl-2, myc, CD10, Mum-1 ve moleküler olarak bcl-2 ve myc ekspresyonları değerlendirildi. Alınan sonuçlara göre morfolojik subgruplar belirlenerek bu subgrupların sağkalıma etkilerinin olup olmadığı araştırıldı. Moleküler olarak Polimerize Zincir Reaksiyonu ile (PCR) bcl-2 ve myc birlikteliği tespit edilen DHL vakalarının prognozları, prognozlarına etkili olabilecek ek parametreler, bu vakaların morfolojik varyantlarla ilişkileri belirlendi.

3.1. İmmünohistokimyasal Analiz

Çalışmaya dahil edilen 31 parafine gömülü doku örneğinin tamamında bcl-6 Ab-2 Monoclonal Antibody (BL6.02; same as PG-B6p, Thermo Scientific, MS-1114-R7, USA), bcl-2 A1 Monoclonal Antibody (ab24502, Abcam, UK), myc Ab-2 Monoclonal Antibody (9E10.3, Thermo Scientific, MS-139P0, USA), CD10 (56C6, Leica, NCL-CD10-270) ve Mum-1 protein Monoclonal Antibody (Mum-1p, Dako, m7259, Denmark) ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. Boyama işlemi için pozitif şarjlı lam üzerine 4 µ'luk doku kesiti alınarak doku, parafinden ayrılması için 60 °C'lik etüvde 60 dakika ve üç farklı xylene içinde 5'er dakika bekletildi. Deparafinizasyon işlemi sonunda üç farklı %96'luk alkol, çeşme suyu ve distile suda 1'er dakika bekletilerek boyama öncesi genel hidrasyon sağlandı. Yine boyamaya başlamadan önce 1/10 dilüe EDTA Buffer (pH:8) içeren kapta

yaklaşık 60 dakika bekletilen dokuda antijenitenin açığa çıkarılması sağlandı. Boyama işlemi nemli ortamda kapalı kutu içerisinde yapıldı ve solüsyonlar, doku üzerini örtecek şekilde damlatıldı. Öncelikle lam hidrojen peroksidadza (%3 aköz) 10 dakika bekletilerek endojen peroksidadz aktivitesi önleildi. Ardından distile suda 30 saniye, fosfat buffer salinde (PBS, pH:7.4) 3 dakika (lama 3 kez sıkılır) bekletildi ve ultra V block solüsyonunda 5 dakika tutularak zemin boyanması gibi nonspesifik bağlanma reaksiyonları önleildi. Daha sonra lam üzerine primer antikör damlatıldı ve 1 saat inkübasyona bırakılarak antikör bağlanması sağlandı. Primer antikörden sonra sırasıyla PBS 3 dakika, LİNK 20 dakika, PBS 3 dakika, streptavidin 20 dakika, PBS 3 dakika, kromojen, AEC 1-5 dakika bekletildi. Akan çeşme suyunda 30 saniye yıkandıktan sonra hematoksilen boyası 1 dakika uygulanarak kontrast boyanma sağlandı. Akan çeşme suyunda 1 dakika ve distile suda 30 saniye yıkanan lam üzerindeki kesitler havada kurutulduktan sonra aköz kapama maddesi 4 damla damlatılarak lamel ile kapatıldı ve ışık almayan ortamda muhafaza edildi. Takiben hazırlanan preparatlar mikroskopta incelenerek boyanma dereceleri yarı kantitatif bir yöntemle değerlendirildi. Pozitif boyanan tümör hücrelerinin tüm tümör dokusuna oranı belirlendi. Tümör hücrelerinin %30'dan fazlası boyanmışsa pozitif, boyanan tümör hücrelerinin oranı %30'dan az ise negatif olarak kabul edildi. Pozitif ve negatif sonuçlara göre Hans algoritması kullanılarak vakaların morfolojik olarak GMBH, GMBH-dışı şeklinde sınıflaması yapıldı. Ayrıca myc ve bcl-2 birlikteliği tespit edilen vakalar DHL olarak belirlendi.

3.2. Polimerize Zincir Reaksiyonu

Her hastanın parafine gömülü doku bloklarından 5'er adet 5 mikron kalınlığında kesitler PCR çalışılmak üzere eppendorf tüplerine alındı. Eppendorf tüpleri içerisinde bulunan doku kesitlerinden ilk aşamada RNA elde etmek amacıyla QIAGEN Rneasy FFPE kiti kullanıldı. Çalışma öncesinde kit içerisinde bulunan buffer RPE üzerine 44 ml etanol (%96-100) eklenip karıştırıldı, ayrıca DNase I üzerine tüpün kapağını açmadan enjektör yardımıyla 550 µl RNase free su eklenip karıştırıldı. Hazırlanan solüsyonlar -20 °C'de saklandı. Çalışmada kullanılacak doku kesitleri üzerine 1 ml ksilen konularak 2 dk santrifüje edildi ve süpernatant atıldı. Ardından 1 ml %96'lık alkol eklendi ve 2 dk santrifüje edilip süpernatant atıldı. Kalan pellet oda ısısında 10 dk ya da 37 °C'de 5 dk bekletilerek kurutuldu. Kurutma işlemi sonrasında 240 µl PKD ve 10 µl proteinaz K eklenerek vortekse konuldu.

Daha sonra 56 °C'de 15 dk ardından 80 °C'de 15 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda buz üzerinde 3 dk bekletilen eppendorf tüpleri 13.500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kalan pellete dokunmadan süpernatant kısım alınarak yeni eppendorf tüpüne konuldu ve üzerine 25 µl DNase Booster ve 10 µl DNase I eklendi. Oluşan karışım vortexlendikten sonra 15 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 500 µl RBC buffer eklenip vortexlendikten sonra 1200 µl etanol (%100) eklendi ve yeniden vortexlendi. Oluşan karışımdan 700 µl alındı ve RNeasy minElute spin kolona aktarıldı. Bir dk 10 000 rpm'de santrifüj edildi ve toplama tüpündeki sıvı döküldü. Eppendorf tüplerindeki tüm sıvı kolondan geçene kadar aynı işlem tekrarlandı. Daha sonra kolon üzerine 500 µl buffer RPE eklendi ve 15 sn 10 000 rpm'de santrifüj edildi. Ardından toplama tüpü döküldü. Kolon üzerine 500 µl buffer RPE eklendi ve 2 dk 10 000 rpm'de santrifüje edildikten sonra kolonlar temiz bir toplama tüpüne aktarıldı. Tüp ağzı açık olarak 5 dk en yüksek devirde santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolonlar eppendorf tüplerine aktarıldı ve üzerine 25 µl RNase-free su eklendi. Bir dk bekletildikten sonra en yüksek devirde 1 dk santrifüje edildi. Elde edilen RNA -20 °C'ye alındı.

Elde edilen RNA'dan cDNA sentezinde RT² HT First Strand kit (96)-330411 kullanıldı. İşlem sırasında kullanılacak GE2 (genomik DNA eliminasyon buffer) ve BC4 (RT master mix) solüsyonları -20 °C'den çıkarılarak buz üzerinde eritildi. Her bir örnek için 0,2 ml'lik PCR tüplerine 6 µl GE2 çözültisi eklendi. Tüpe 8 µl RNA örneği konuldu. Tüpler santrifüj edilip thermo cycle'de 37 °C'de 5 dk bekletildi. Daha sonra thermo cycle'dan alınan tüp içerisine 6 µl BC4 çözültisinden eklendi ve pipetlenerek karıştırıldı ve santrifüj edildi. Sırasıyla 42 °C'de 15 dk, 95 °C'de 5 dk ve 4 °C'de bekleme protokolü takip edilerek reverse transkripsiyon işlemi sağlandı ve sonrasında buz üzerine alınan örnekten cDNA preamplifikasyon aşamasına geçildi. cDNA preamplifikasyon aşamasında RT² PreAMP cDNA Synthesis-3304551 kiti kullanıldı. Bcl-2 ve myc genleriyle birlikte bir kontrol geni (GAPDH) çalışılacağından üç gen için ayrı RT² qPCR primer assaylerden 40'ar µl (toplam 120µl) 880 µl nuclease-free su ile karıştırıldı ve 1000 µl'lik primer havuzu oluşturuldu. Daha sonra elde edilen bu RT² q PCR Primer Assay karışımından alınan 7,5 µl kit içerisinde bulunan RT² PreAMP PCR Mastermix'ten alınan 12,5 µl ile karıştırıldı ve 20 µl'lik karışım elde edildi. Bu 20 µl'lik karışım PCR tüpüne alındı ve cDNA sentez protokolüyle elde edilen cDNA 'dan 5µl bu karışıma ilave edildi. Karışım thermo cycle'da 1 siklus 10 dk 95 °C'da (HotStart DNA Taq Polimeraz bu aşamada aktifleşir), 8 siklus sırasıyla 15 sn 95 °C'de ve 2 dk 60 °C'de, en son olarak 4 °C'de

bekletilerek amplifiye edildi. Karışım thermal cycle'dan alındıktan sonra yine kit içerisinde bulunan Side Reaction Reducer'dan 2 µl eklendi ve 37 °C'de 15 dk sonrasında 95 °C'de 5 dk bekletildi. Real-time PCR aşamasına geçilmeden en son 27 µl olan çözeltiliye 28 µl su ilave edildi. Real-time PCR aşamasında PCR tüpünde kit içerisinde bulunan RT² SYBR Green Mastermix'ten (12,5 µl), RT²qPCR Primer Assay'den (1 µl), daha önceki reaksiyonlarda elde edilen cDNA'dan (1 µl) ve RNase-free sudan (10,5 µl) oluşan 25 µl'lik bir karışım elde edildi. Solüsyonların iyice karışması için 1000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Daha sonra real-time cycle içerisinde 1 siklus 10 dk 95 °C'de (HotStart DNA Taq Polimeraz aktivasyonu gerçekleşir), 40 siklus sırasıyla 15 sn 95 °C'de ve 1 dk 60 °C'de (floresans veri toplama aşaması) protokolü uygulandı. İşlem sonucunda her gen için bir Ct (threshold cycle) değeri elde edildi. Orijinal gen ekspresyon değeri ile Ct arasında bir ters orantısal ilişki bulunduğundan ilgili her gen için orijinal ekspresyon düzeyi $(L)^{2^{-Ct}}$ olarak ifade edildi. Bir kontrol genine göre ilgili genin ekspresyon düzeyinin normalizasyonu iki genin ekspresyon düzeylerinin oranlanmasıyla bulundu. Gen ekspresyonunun katlı değişiminin (fold change) saptanması için ilgili genin ekspresyon düzeyinin normalizasyonu kontrol örneğine oranlandı. Fold-regülasyon biyolojik olarak anlamlı kat değişimlerini ifade etmekte kullanıldı. Fold-change değeri >1 ise up-regülasyon ya da pozitiflik, <1 olması durumu ise down regülasyon ya da negatiflik olarak kabul edildi. Bcl-2 ve myc pozitifliğinin birlikte olduğu vakalar DHL olarak kabul edildi.

3.3. İstatistiksel Yöntem

Verilerin analizi SPSS for Windows 13.0 paket programında yapıldı. Hastaların DHL mevcudiyeti immunhistokimyasal ve PCR sonuçlarına göre ayrı ayrı değerlendirildi. DHL tespit edilen ve GMBH, GMBH-dışı varyantlara sahip hastalar belirlendi. Kaplan Meier yöntemi ile sağkalım analizleri yapıldı. DHL tanımlamasında kullanılan myc ve bcl-2 genlerinin tespitinde immunhistokimyasal ve PCR yöntemlerinin spesifite ve sensitiviteyi değerlendirildi. Bu değerlendirmelerde kategorik veriler arasındaki ölçümle belirlenenlerin karşılaştırılmasında Ki-Kare testi, ölçümsel verilerin karşılaştırılmasında veriler normal dağılıma uyuyorsa Student's Testi, uymuyorsa Mann-Whitney-U testi kullanıldı. P < 0.01 olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. PCR yöntemi ile saptanan myc translokasyonu ve bcl-2 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi değerlendirmede Pearson korelasyon analizi kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 31 hastanın 17'si (%54.8) kadın, 14'ü (%45.2) erkek olup ortalama yaş 57 olarak bulundu. 50 yaş ve üzerinde 22 hasta (%70.9), 50 yaş altında ise 9 hasta (%29.1) mevcuttu.

Çalışmada yer alan hastaların primer tutulum alanlarına bakıldığında; 8 hastanın mide ve 3 hastanın ise kolonundan alınan örneklerden tanı konmuş olup gastrointestinal sistem tutulumunun daha sık (%35.5) olduğu, bu sıklığı ikinci sırada tonsil tutulumunun (%12.9) takip ettiği gözlemlendi.

Tüm gruba ait olan genel demografik özellikler Tablo 6' da gösterilmektedir.

Tablo 6. Hastaların demografik özellikleri

Demografik Özellik	N (31)	%
Yaş Grupları		
<50 Yaş	9	29.1
>50 Yaş	22	70.9
Cinsiyet		
Erkek	14	45.2
Kadın	17	54.8
Primer Tutulum Alanı		
Gastrointestinal Sistem	11	36.6
Tonsil	4	12.9
Diğerleri (Beyin, Testis, Cilt, Kemik, Over, Böbrek, Kemik)	14	45.1

Vakaların tümünde ektranodal tutulum diffüz ve dissemine olduğundan evreleri evre IV olarak kabul edildi. IPI skoru; 4 hastada 2 (%12.9), 27 hastada 3 ve üzeri (%87.1) olarak bulundu (Tablo 7).

Tablo 7. IPI skoruna göre hasta sayıları

IPI skoru	N (31)	%
0-1	-	-
2	4	12.9
3	18	66.6
4	9	20.5

Hastalarda kemik iliği tutulumu mevcut olmayıp, 10 tanesinde (%32.3) tanı anında B semptomlarının mevcuttu.

Hastaların tanı anında tam kan sayımlarından tespit edilen ortalama lökosit sayısı 7700/ μ l (3000-12800/ μ l), hemoglobin değeri 12.3 g/dl (9.7-15.3 g/dl), trombosit sayısı 318387/ μ l (155000-474000/ μ l), monosit sayısı 700/ μ l (200-2500/ μ l) ve lenfosit sayısı 1700/ μ l (700-4300/ μ l); ortalama LDH düzeyi 440 U/L (178-922 U/L), sedimantasyon hızı 41 (4-120), CRP seviyesi 3.23 mg/dl (0.1-45 mg/dl) olarak bulundu.

İmmunhistokimyasal yöntemle bcl-2 ekspresyonunun 7 (%22.6) hastada, myc ekspresyonunun ise 2 (%6.5) hastada pozitif olduğu, buna karşılık PCR'la bcl-2'nin 6 (%19.4) hastada, myc'nin ise 21 (%67.7) hastada eksprese olduğu izlendi. İmmunhistokimyasal olarak bcl-2 ve myc'nin birlikte eksprese edildiği 1 hasta saptanırken, PCR ile 6 hastada (%19.35) bcl-2 ve myc birlikte ekspresyonu gözlemlendi. (Tablo 8).

Tablo 8. Bcl-2 / Myc ekspresyon birlikteliği hasta sayıları

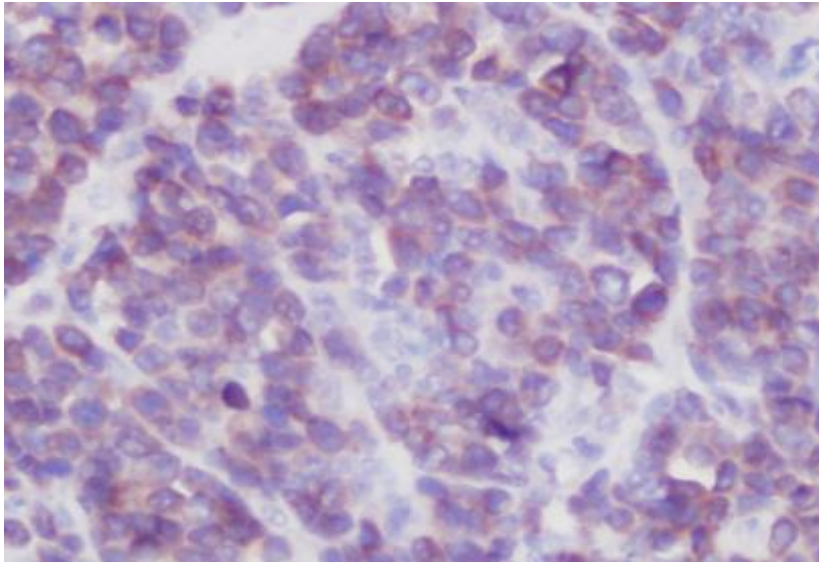
	Bcl-2 / Myc (+)	Bcl-2 / Myc (-)
İmmunhistokimyasal yöntemle	1	30
PCR yöntemiyle	6	25

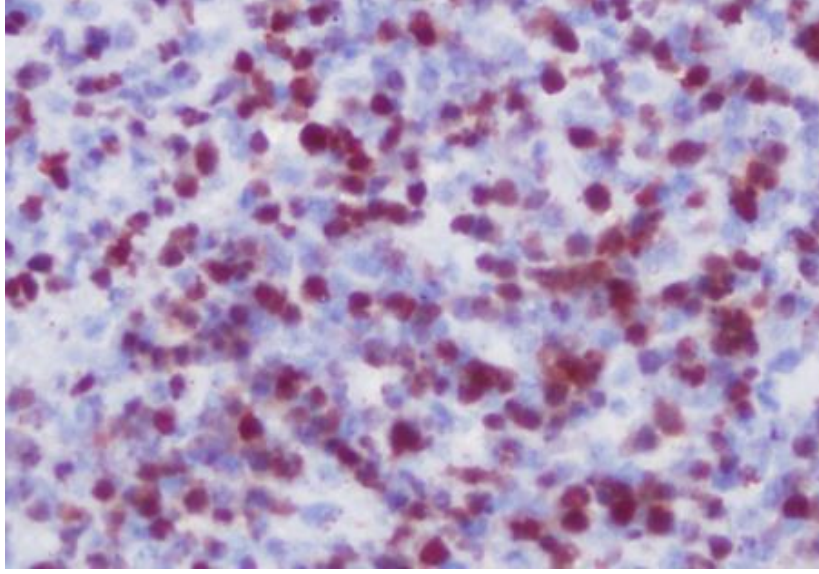
PCR'nin bcl-2 ekspresyonunu saptamadaki sensitivitesi %33.3, spesifisitesi ise %80, myc ekspresyonu saptamadaki sensitivitesi %95, spesifisitesi ise %90.9 idi (Tablo 9).

Tablo 9. PCR yönteminin spesifite ve sensitivitesi

	Myc		Bcl-2	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
İmmunhistokimyasal	2	29	7	24
PCR	21	10	6	25
	PCR		PCR	
	Spesifite: %90.9		Spesifite: %80	
	Sensitivite: %95		Sensitivite: %33.3	

İmmunhistokimyasal yöntemle tespit edilen bcl-2 ekspresyonun gözlendiği vakalarından 2 tanesinin (%33.3) PCR yöntemi ile saptanan DHL'li gruba dahilken, myc ekspresyonun gözlendiği vakaların ise 1 tanesinin (%16.7) PCR yöntemi ile saptanan gruba dahil olduğu gözlendi (Şekil 2, 3).

**Şekil 2.** İmmunhistokimyasal boyama ile Bcl-2 ekspresyonu



Şekil 3. İmmun histokimyasal boyama ile Myc ekspresyonu

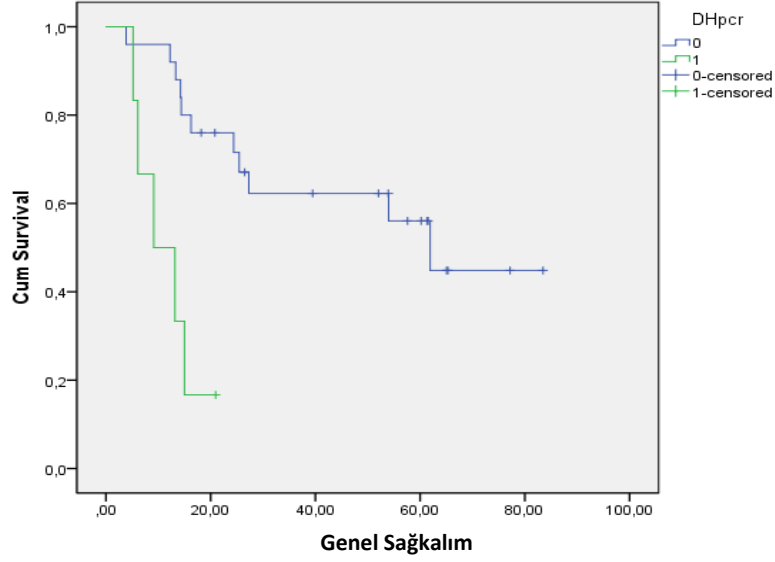
DHL tespit edilen bu 6 vakanın 4' ü (%66.7) kadın, 2' si (%33.3) erkek cinsiyette olup bu cinsiyet dağılımında sayısal üstünlük dışında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı. IPI skorlamasında tüm hastaların IPI skorunun 3'ün üstünde olduğu gözlemlendi. Hastaların yarısında başvuru anında B semptomları mevcut olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 10).

Tablo 10. DHL hastalarının genel özellikleri

DHL	N (6)	%	P
Cinsiyet			AD
Kadın	4	66.7	
Erkek	2	33.3	
IPI Skoru			AD
<3	-		
>3	6	100	
B Semptomu			AD
Var	3	50	
Yok	3	50	

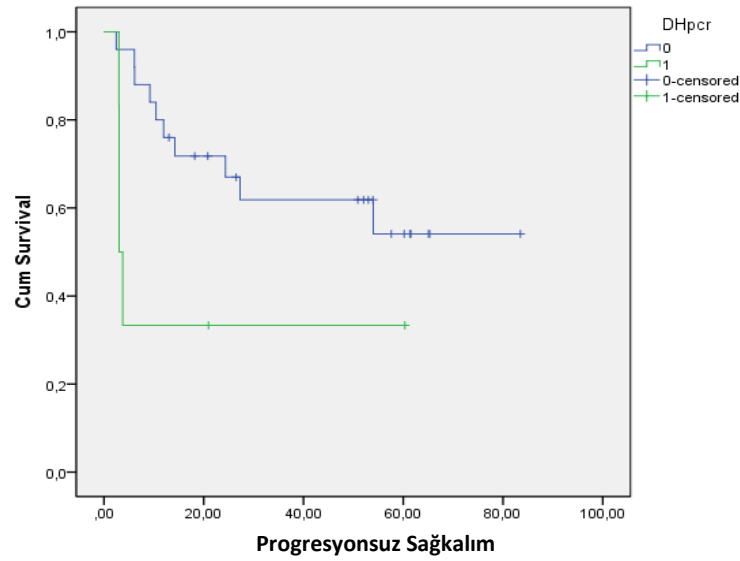
AD: Anlamlı değil

PCR ile saptanan 6 DHL'li hastanın 3 aylık genel sağkalımı %50, DHL olmayan grupta %88; DHL' lı hastaların 6 aylık genel sağkalım oranı %16 iken, DHL olmayan hastalarda %76 olup istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.001$), (Şekil 4), (Tablo 11).



Şekil 4. DHL hastalarının genel sağkalımı

DHL hastalarının 3 ve 6 aylık progresyonsuz sağkalım süresine bakıldığında ise 3 aylık progresyonsuz sağkalımın DHL'li hastalarda %50.6, 6 aylık progresyonsuz sağkalımın ise %33 olduğu gözlenirken, DHL olmayan hastalarda 3 aylık progresyonsuz sağkalım %88.6, 6 aylık progresyonsuz sağkalım ise %76 olarak saptanmış olup, istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.001$), (Şekil 5), (Tablo 11).



Şekil 5. DHL hastalarının progressyonsuz sağkalımı

Tablo 11. DHL hastalarının genel ve progressyonsuz sağkalımı

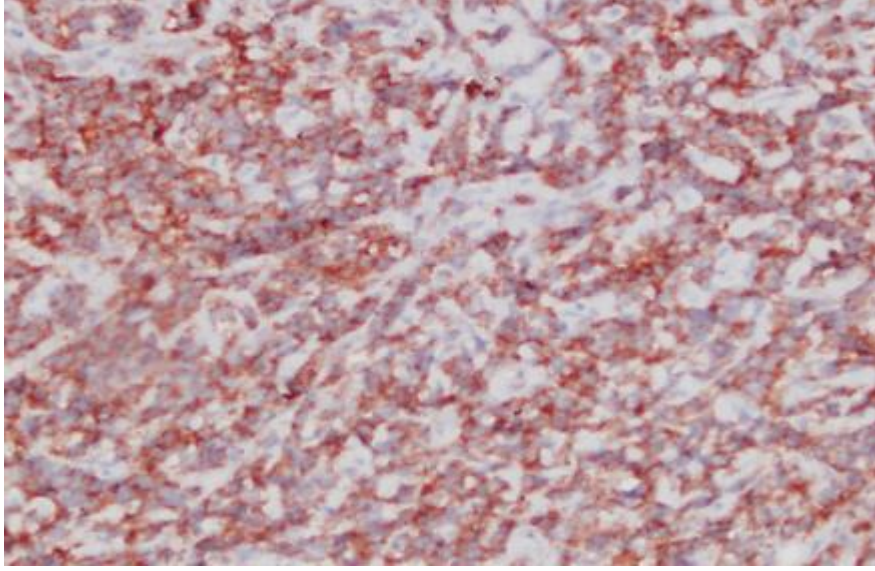
	DHL + %	DHL - %	P
3 Aylık Genel Sağ Kalım	50	88	
6 Aylık Genel Sağ Kalım	16	76	<0.001
3 Aylık Progressyonsuz Sağkalım	50.6	88.6	
6 Aylık Progressyonsuz Sağkalım	33	76	<0.001

Aynı zamanda, DHL'li hastalarda PCR ile bakılan MYC ve BCL-2 titrelerindeki yüksekliğinde istatistiksel olarak korelasyon gösterdiği izlendi ($r: 0.45$, $p<0.01$), (Tablo 12).

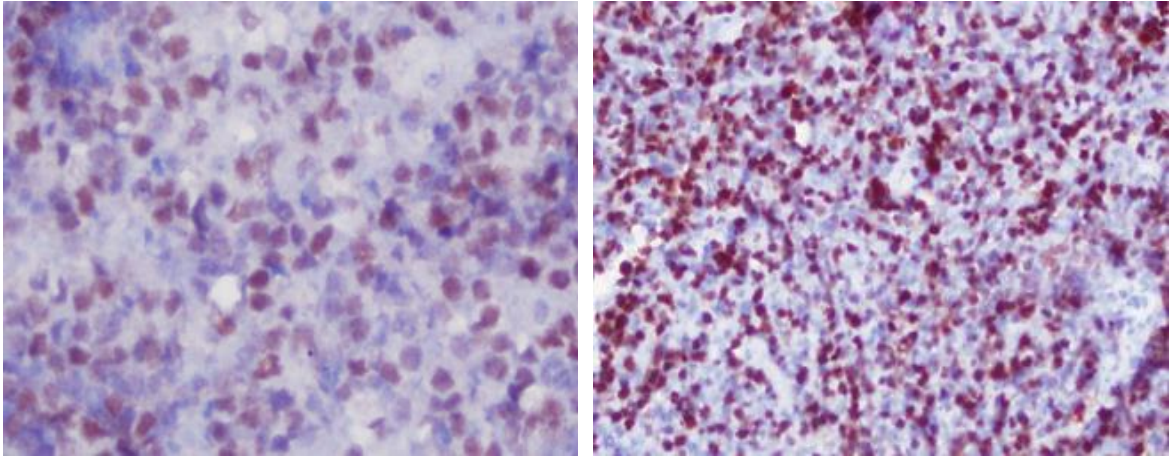
Tablo 12. Myc ve Bcl-2 PCR korelasyon analizi

	Myc PCR	Bcl-2 PCR
Myc PCR PearsonCorrelation	1	0,363
Sig.		0,45
N		31
	31	
Bcl-2 PCR Pearson Correlation	0,363	1
Sig.	0,45	
N	31	31

Hans algoritması kullanılarak histopatolojik olarak 21 hasta (%67.7) GMBH-dışı, 10 hasta (%32.3) GMBH olarak tanımlanmış olup (Şekil 6, 7), iki grup arasında cinsiyet, evre, IPI skoru, B semptomları varlığı, progresyonsuz ve genel sağkalımları değerlendirildiğinde anlamlı fark olmadığı saptandı (Tablo 13, 14), (Şekil 8, 9).



Şekil 6. İmmunhistokimyasal boyama ile CD10 pozitif GMBH varyant



Şekil 7. İmmunhistokimyasal boyama ile Bcl-6 ve Mum-1 pozitif GMBH-dışı varyant

Tablo 13. GMBH / GMBH-dışı DBBHL hastalarının genel özellikleri

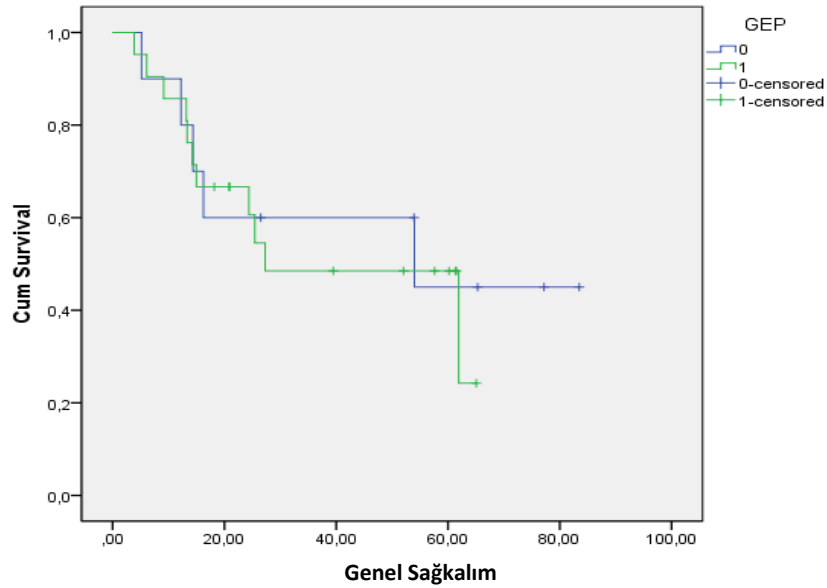
	GMBH (N:10)	GMBH-dışı (N:21)	P
Cinsiyet			AD
Kadın	6	11	
Erkek	4	10	
IPI Skoru			AD
<3	3	13	
>3	7	20	
B Semptom			AD
Var	4	6	
Yok	6	15	

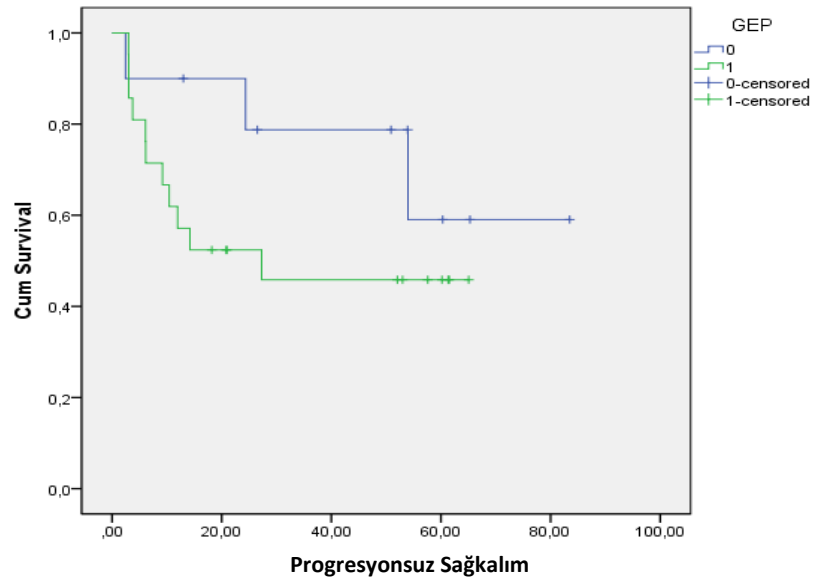
AD: Anlamlı değil

Tablo 14. GMBH / GMBH-dışı DBBHL hastalarının genel ve progresyonsuz sağkalımı

	GMBH %	GMBH-dışı %	P
3 aylık genel sağ kalım	70	85	AD
6 aylık genel sağ kalım	45	71	AD
3 aylık progresyonsuz sağkalım	78	85	AD
6 aylık progresyonsuz sağkalım	59	71	AD

AD: Anlamlı değil

**Şekil 8.** GMBH / GMBH-dışı DBBHL hastalarının genel sağkalımı



Şekil 9. GMBH / GMBH-dışı DBBHL hastalarının progressyonsuz sağkalımı

DHL vakalarının histopatolojik altgruplarına bakıldığında vakaların 5'inin GMBH-dışı, 1'inin GMBH orjinli olduğu tanımlanmış olup istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.01$), (Tablo 15). Histopatolojik alt grupların DHL vakalarında prognozunda etkili olmadığı gözlemlendi.

Tablo 15. DHL hastalarının histopatolojik gruplara göre dağılımı

	DHL (N:6)		P
GMBH	1	AD	
GMBH-dışı	5	AD	

AD: Anlamlı değil

5. TARTIŞMA

Klinik ve histopatolojik açıdan oldukça heterojen bir lenfoma grubu olan DBBHL NHL'lerin en sık görülen tipini oluşturmaktadır. Hastaların yaklaşık 1/3'ünde bir veya birden fazla ektranodal tutulumun olmasına karşın nodal tutulum izlenmemekte olup bu durum ektranodal hastalık olarak tanımlanmaktadır. Moleküler çalışmalarda nodal ve ektranodal hastalıkların genetik olarak farklı kökenden kaynaklandığının saptanması üzerine, nodal ve ektranodal lenfomaların farklı biyolojik ve klinik özelliklere sahip olduğu düşünölmeye başlanmıştır (71). Moller MB ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, ektranodal ve nodal DBBHL'lerin klinik özelliklerinin farklı olduğu belirtilerek ektranodal tutulum ile seyreden hastaların daha yaşlı ve performansının düşük olmasına karşın tümör yüklerinin daha düşük olduğu izlenmiş ve ektranodal tutulumlu evre IV hastaların yaşam sürelerinin nodal tutulum ile seyreden düşük evredeki hastalara göre daha uzun olduğu saptanmıştır (29).

Farklı özelliklere sahip olmasına karşın nodal lenfomalarda olduğu gibi ektranodal lenfomalarda da prognozu belirlemede IPI skoru kullanılmaktadır. Ancak IPI skorlama sistemi prognozu belirlemede yetersiz kaldığından, hastaların gen ekspresyon profilleri genel sağkalım ve tedavi cevaplarını değerlendirmede kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla immünhistokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılarak hastalar GMBH ve GMBH-dışı olarak ayrılmış ve bu farklı iki histopatolojik tipin hastaların prognozunu etkilediği saptanmıştır.

Hans CP ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CD10 ve/veya CD10, Bcl-6 (+) ve Bcl-6 (+), CD10, Mum-1 (-) olan GMBH-DBBHL'li hastalarda 5 yıllık sağkalım oranını %76, CD10, Bcl-6 (-) veya Bcl-6, Mum-1(+) GMBH-dışı DBBHL'li hastalarda ise %34 olarak bulunmuş ve sensitive GMBH için %70, GMBH-dışı için %87 olarak tanımlanmıştır (38). Benzer bir çalışmada ise 5 yıllık genel sağkalım GMBH-DBBHL'de %68, GMBH-dışı DBBHL'de ise %24.7 olarak bulunmuş ve GMBH-DBBHL'nin daha iyi prognoza sahip olduğu belirtilmiştir (72). Barrans SL ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir

çalışmada da GMBH-DBBHL'nin genel sağkalımlarının daha iyi olduğu izlenmiştir (73). Buna karşılık, Jorge D.C ve arkadaşları GMBH-dışı DBBHL'li hastaların genel ve progresyonsuz sağkalım oranlarının GMBH-DBBHL'ye daha kısa olmakla birlikte multivaryant survey analizlerinde benzer sonuçlar sağlanamadığını göstermişlerdir (74). Birçok çalışmada benzer sonuçlar elde edilmesi sonrasında, Bret C ve arkadaşları gen ekspresyon profili farklılıklarının CHOP veya R-CHOP ile tedavi edilen hastalarda IPI'den bağımsız bir prognostik faktör olduğunu, ancak IPI ve gen ekspresyon profil birlikteliğinin daha güçlü bir prognostik sınıflama olabileceğini belirtilmiştir (75).

Bizde çalışmamızda, ektranodal DBBHL hastalarda IPI skoru ve hastalık evresinin genel ve progresyonsuz sağkalıma etkisinin olmadığını saptadık. Aynı zamanda GMBH-DBBHL ve GMBH-dışı DBBHL'ler arasında da genel ve progresyonsuz sağkalım açısından farklılık izlenmiyordu. Yapılan çalışmalarda GMBH-dışı DBBHL'li hastalarda nükleer faktör-kappa B (NF-kB) hedef genlerinin yoğun olarak bulunduğu ve Rituximab'ın NF-kB'yi baskıladığı gösterilmiştir (76). Fu K ve arkadaşları kemoterapi protokollerine Rituximab eklenmesinin GMBH ve GMBH-dışı DBBHL'li hastaların yaşam sürelerinde izlenen farklılığı düzelttiğini göstermişlerdir (77). Li Y ve arkadaşları da GMBH-dışı DBBHL'li hastalarda R-CEOP tedavisi ile 5 yıllık sağkalım oranlarının CEOP tedavisi alanlara göre daha yüksek olduğunu, GMBH -DBBHL hastalarda ise iki tedavi protokolü arasında ortalama sağkalım açısından fark olmadığını belirtmişlerdir (78). Bizim çalışmamızda da tüm hastaların tedavisinde CHOP tedavi protokolü birlikte Rituximab kullanıldı. Dolayısıyla GMBH ve GMBH-dışı DBBHL'li hastalarda total ve progresyonsuz yaşam sürelerinin farklı olmaması, bize tedavide Rituximab kullanımının etkili olduğunu telkin etmekteydi.

Bcl-2 ve myc geni yeniden düzenlenmesinin birlikte olduğu NHL'ler daha hızlı seyirli ve ileri evrede olup, kemik iliği ile MSS tutulumu sıklıkla izlenmektedir. Carlo V. ve arkadaşları 327 DBBHL'li hastada saptadıkları 8 DHL'li olguda R-CHOP tedavisi sonrası ortalama 12. ayda relaps geliştiğini ve dolayısıyla DHL'lerin daha kötü prognoza sahip olduklarını belirtmişlerdir (79). DHL görülme sıklığını ve prognozunu değerlendiren birçok çalışmada da benzer şekilde DHL'nin daha kötü prognoza sahip olduğu ve dolayısıyla hastaların yaşam sürelerinin daha kısa olduğu tanımlanmıştır (41, 80, 81). Ülkemizden Akyürek ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise, 239 DBBHL'li olguda saptanan 6 DHL hastasının prognozlarının daha kötü ve ortalama sağkalım sürelerinin 9 ay olduğu belirtilmiştir (82). Ayrıca Tomita N ve arkadaşlarının yapmış

olduğu bir çalışmada bu gruptaki hastaların standart R-CHOP tedavisi ya da kemik iliği transplantasyonunu da içeren tedavilere iyi sonuç vermediğini bildirmişlerdir (4). Bizim çalışmamızda da saptadığımız 6 DHL'li hastada 3 aylık genel ve progresyonsuz sağkalımları sırasıyla %50-%50.6 iken, DHL olmayan grupta ise %88-%88.6 olarak bulundu. 6 aylık genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım oranı sırasıyla %16 ve %33 iken, DHL olmayan hastalarda bu oran %76-%76 idi. Sonuç olarak, tüm hastalar R-CHOP tedavisi almasına rağmen DHL'li hastalarda genel ve progresyonsuz sağkalım süreleri kısa olması bize DHL'in biyolojik davranışının farklı olabileceğini ve tedaviye Rituximab eklenmesinin de tedavi başarısını artıramadığını göstermekteydi.

Yapılan çalışmalarda DHL'li hastaların IPI skorlarının yüksek olduğu gözlenmiştir. Daniel J ve arkadaşlarının çalışmasında 17 DHL hastasında %94 oranında LDH yüksekliği saptanmış olup, vakaların 14 ü evre 4, 10 hastanın IPI skorlaması 3 ve üzeri olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada 9 vakada kemik iliği tutulumu ve ektranodal tutulum izlenirken ve 7 hastada B semptomları mevcut olduğu görülmüştür. DHL'li hastalarda LDH düzeyi ve kemik iliği tutulumu anlamlı olarak yüksek olarak saptanmıştır (83). Bir başka çalışmada ise 29 DHL'li hastanın 16'sında B semptomları varlığı, 22'sinde yüksek IPI skoru ve 21'inde ileri evre 4 hastalık izlenmiştir (84). Ancak bizim çalışmamızda hastalık evresi, LDH düzeyi, IPI skoru benzer olmasına karşın DHL'li hastaların genel ve progresyonsuz yaşam süresinin kısa olması, DHL ilişkili verilerin nodal ve ektranodal DBBHL'lerin birlikte değerlendirildiği çalışmalardan farklı olarak sadece ektranodal DBBHL'lerin değerlendirilmesine bağlı olabilir. Literatürde ilk kez sadece ektranodal DBBHL'leri içeren bu çalışmada prognostik faktörlerden bağımsız olarak DHL'lerin kısa yaşam süresiyle birlikte olması, DHL'lerin klinik özelliklerinin farklı olduğunu göstermesi açısından oldukça önem arz etmekteydi.

Çalışmamızda, ektranodal DHL'li hastaların histopatolojik değerlendirmesinde GMBH veya GMBH-dışı DBBHL varlığı genel ve progresyonsuz sağkalım üzerine etki göstermiyordu. Literatüre baktığımızda bu konuda farklı veriler olduğunu görmekteyiz. Shimin HU ve Kobayashi T ile arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda hastalar GMBH/ GMBH-dışı olarak ayrıldığında yaşam süreleri değişmezken, DHL'li hastalarda GMBH-dışı kaynaklı hastalık varlığı kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Buna karşılık Perry AM ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise DHL'li hastalarda GMBH hücre varlığının kötü prognoza neden olduğu gözlenmiştir (85, 86, 101). Bizim çalışmamızda ise ektranodal DBBHL köken aldığı doku bölgesinden bağımsız olarak DHL özelliği

varlığında kötü prognoz ile birlikteydi. Bu durum bize DHL'nin prognozu göstermede bağımsız bir faktör olduğunu göstermekteydi. Ayrıca, çalışmamızda DHL'yi göstermede immünohistokimyasal tetkiklere göre moleküler yöntemlerin daha sensitif ve spesifik olduğu gözlemlendi. İmmünohistokimyasal olarak 1 hastada DHL saptanırken, moleküler yöntemle 6 hastada DHL olduğu saptandı. Moleküler yöntemin bcl-2 ekspresyonunu saptamadaki sensitivitesinin %33.3, spesifitesinin ise %80, myc ekspresyonu saptamadaki sensitivitesinin %95, spesifitesinin ise %90.9 olduğu tespit edildi. Aynı zamanda bcl-2/myc ekspresyon artışlarının korelasyon gösterdiği izlendi. Bu durum bize immünohistokimyasal olarak DHL olarak tanımlanamayan hastaların moleküler yöntemlerle tanımlanabileceğini ve tanımlanan hastalarında prognozunun daha kötü olduğunu gösteriyordu. Nitekim yapılan çalışmalarda da moleküler yöntemlerin daha hassas olduğu, ancak immünohistokimyasal tetkikler gibi tarama testi olarak kullanımının zor olabileceği belirtilmektedir. Gelecekte standartlarının geliştirilmesi ile daha geniş klinik kullanımın olanağı bulacağı düşünülmektedir (88, 89).

Sonuç olarak, ektranodal DBBHL'li hastalarda DHL varlığının genel ve progresyonsuz yaşam süresinde azalmaya neden olan bağımsız bir risk faktörü olduğu ve hastaların tedavisinin planlanmasında önemli olabileceği kanatına varıldı.

6. SONUÇ

Ekstranodal DBBHL'li hastalarda immünohistokimyasal ve moleküler yöntemlerle (PCR) saptanan DHL varlığının genel ve progresyonsuz sağkalıma etkisinin değerlendirildiği çalışmada:

- İmmünohistokimyasal yöntemle bcl-2 ekspresyonu 7 (%22.6) hastada, myc ekspresyonunu ise 2 (%6.5) hastada izlendi.
- PCR ile bcl-2 6 (%19.4) hastada, myc ise 21 (%67.7) hastada saptandı.
- İmmünohistokimyasal yöntemle 1 hastada, PCR ile 6 hastada DHL tespit edildi.
- PCR'nin bcl-2 ekspresyonunu saptanmadaki sensitivitesi %33.3, spesifisitesi ise %80, myc ekspresyonu saptamadaki sensitivitesi %95, spesifisitesi ise %90.9 idi. Moleküler yöntemin immünohistokimyasal yöntemle göre daha sensitif ve spesifik olduğu gözlemlendi.
- DHL'li hastalarda PCR ile bakılan myc ve bcl-2 titrelerindeki yüksekliğin korelasyon gösterdiği izlendi.
- DHL hastalarının 3 ve 6 aylık genel sağkalım oranları sırasıyla %50- %16 iken, DHL olmayan hastaların sırasıyla %88-%76 bulundu. 3 ve 6 aylık progresyonsuz sağkalım süresine bakıldığında DHL'li hastalarda sırasıyla %50.6-%33, DHL olmayan hastalarda ise sırasıyla %88-%76 olarak saptandı. DHL hastalarda genel ve progresyonsuz sağkalım belirgin olarak kısaldı.
- GMBH ve GMBH-dışı ekstranodal DBBHL'li hastalarda evre, IPI skoru, progresyonsuz ve genel sağkalım farklı değildi.
- DHL'li hastalarda histopatolojik alt grupların DHL prognozunu etkilemediği izlendi.

7. ÖZET

Ekstranodal Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma'lı Hastalarda Bcl-2 ve Myc Birlikteliğinin Tedavi Yanıtı ve Prognoza Etkisi

Amaç: NHL'nin en yaygın alt tipini oluşturan DBBHL, hastalığın seyrini etkileyen immüfenotipik, sitogenetik ve morfolojik farklılıklar göstermektedir. DBBHL köken aldığı hücrelerin gen ekspresyonlarına göre GMBH, GMBH -dışı ve tip 3 olmak üzere üç farklı histopatolojik alt gruba ayrılmaktadır. Hastalığın histopatolojik alt tipleri hastaların prognozunu etkilemekle birlikte, DHL olarak adlandırılan myc ve bcl-2 gen ekspresyon birlikteliği kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada, ekstranodal DBBHL'lı hastalarda immünhistokimyasal ve moleküler yöntemlerle saptanan DHL'nin genel ve progresyonsuz sağkalıma etkisinin araştırılması planlandı.

Materyal Metod: Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim dalında 2008-2013 yılları arasında ekstranodal DBBHL tanısı alan 31 hasta dahil edildi. Düşük dereceli B hücreli lenfoma'dan transforme olan ve HIV pozitif olan olgular çalışmaya alınmadı. Hasta bilgileri retrospektif olarak incelendi ve hastaların tanı yaşı, cinsiyeti, ekstranodal tutulum alanları, hastalık evresi, risk grubu, histopatolojik tanısı, IPI skoru, tanı anındaki LDH düzeyi, kemik iliği tutulumu ve B semptomları varlığı, almış oldukları tedaviler değerlendirilerek progresyonsuz ve genel sağkalım süreleri tanımlandı. Tüm hastaların patolojik dokularında, immünhistokimyasal boyamayla bcl-6, bcl-2, myc, CD10, Mum-1 ve moleküler olarak PCR yöntemi ile bcl-2 ve myc ekspresyonları değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmaya alınan 31 ekstranodal DBBHL hastasının 17'si kadın, 14'ü erkek olup ortalama yaş 57 idi. İmmünhistokimyasal yöntemle bcl-2 ve myc birlikteliğinin olduğu 1 DHL saptanırken, moleküler analiz ile 6 hastada DHL izlendi. PCR'nin bcl-2 ekspresyonunu saptamadaki sensitivitesi %33.3, spesifisitesi %80, myc ekspresyonu saptamadaki sensitivitesi %95, spesifisitesi %90.9 olup, myc ve bcl-2 titrelerindeki yükseklik arasında da korelasyon mevcuttu. DHL'li hastalarının 3 ve 6 aylık genel sağkalım oranları sırasıyla %50- %16 iken, DHL olmayan hastalarda sırasıyla %88-%76 bulundu. 3 ve 6 aylık progresyonsuz sağkalım sürelerine bakıldığında DHL'li hastalarda

sırasıyla %50.6-%33, DHL olmayan hastalarda ise sırasıyla %88-%76 olarak saptandı. DHL'li hastalarda genel ve progresyonsuz sağkalım GMBH, GMBH -dışı histopatolojik tiplerden bağımsız olarak kısa bulundu ($p<0.05$, $p<0.001$).

Sonuç olarak, ektranodal DBBHL'li hastalarda DHL varlığının genel ve progresyonsuz yaşam süresinde kısaltmaya neden olan bağımsız bir etki gösterdiği, DHL'yi tanımlamada moleküler yöntemin immünohistokimyasal değerlendirmeye göre daha spesifik ve sensitiv olduğu, dolayısıyla hastaların tedavisinin planlanmasında önemli olabileceği kanatine varıldı.

8. SUMMARY

Effects of Concurrent Expression of Myc and Bcl-2 on the Treatment and Prognosis in Extranodal Diffuse Large B Cell Lymphoma

Objective: DLBCL is the most common subtype of NHL and has been divided into three different histopathological subtypes according to the gene expression of its precursor cells: GMBH, non-GMBH and type 3. The combined expression of myc and bcl-2, known as DHL, has been associated with poor prognosis. We aimed to investigate the effects of immunohistochemical and molecular presence of DHL (combined expression of myc and bcl-2) on overall and progression-free survival rates of patients with extranodal diffuse large B cell lymphoma (DLBCL).

Material & Methods: A total of 31 patients (17 female, 14 male; mean age 57 years) with diagnosis of extranodal DLBCL were included into the study (patients in the 2008-2013 period, Karadeniz Teknik University Medical School). Patients transforming from low grade B cell lymphoma, and patients with HIV positivity were not included. In a retrospective manner, patient characteristics were noted (age at diagnosis, sex, sites of extranodal involvement, stage, high-risk group, histopathological diagnosis, IPI score, LDH level at diagnosis, bone marrow involvement, and treatment modalities). Histopathological specimens underwent immunohistochemical (bcl-6, bcl-2, myc, CD10, Mum-1) and molecular (bcl-2 and myc, by means of PCR) analysis.

Findings: DHL was observed immunohistochemically in only one patient, while molecular studies found 6 cases. Three-month overall survival rates were 50% and 88% in DHL positive and negative groups, respectively. Six-month overall survival rates were 16% and 76% in DHL positive and negative groups, respectively. Progression-free 3-month survival rates were 51% and 88% in DHL positive and negative groups, respectively. Progression-free 6-month survival rates were 33% and 76% in DHL positive and negative groups, respectively. No relations with histopathological type of the disease were noted.

We conclude that DHL presence in patients with extranodal DLBCL was an independent factor leading to shortened overall or progression-free survival.

9. KAYNAKLAR

1. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H et al, WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition, 2008
2. Poulsen C.B., Borup R., Nielsen F.C., Borregaard N., Microarray-Based Classification Of Diffuse Large B-Cell Lymphoma, European Journal of Haematoloji 74 (2005) 453-465
3. P De Paepe, C De Wolf Peeters, Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Heterogeneous Group Of Non-Hodgkin Lymphomas Comprising Several Distinct Clinicopathological Entities, Leukemia 21 (2007) 37-43
4. Tomita N., Tokunaka M., Nakamura N., Takeuchi K., Koike J., Motomura S. et al. Clinicopathological Features Of Lymphoma/Leukemia Patients Carrying Both Bcl2 And Myc Translocations, Haematologica 94,7 (2009) 935-43
5. Orkin S.H., Zon L.I., Hematopoiesis An Evolving Paradigm For Stem Cell Biology. Cell 132,4 (2008) 631-644.
6. [www.uptodate.com /Normal B And T Lymphocyte Development](http://www.uptodate.com/Normal-B-And-T-Lymphocyte-Development). 2013 jun
7. Bikah G., Carey J., Ciallella J.R., CD5-Mediated Negative Regulation Of Antigen Receptor-Induced Growth Signals In B-1 B Cells, Science (1996) 274: 1906.
8. Li L., Zhang X., Kovacic S., Long A.J., Bourque K., Wood C.R. et al, Identification Of A Human Follicular Dendritic Cell Molecule That Stimulates Germinal Center B Cell Growth, J Exp Med (2000) 191: 1077-84.
9. Oracki S.A., Walker J.A., Hibbs M.L., Corcoran L.M. & Tarlinton D.M, Plasma Cell Development And Survival, Immunol Rev (2010) 237: 140-159.
10. Chan J. K. C. The New World Health Organization Classification Of Lymphomas: The Past, The Present And The Future, Hematological Oncology (2001) 19: 129-150
11. Garvin A. J., Simon R., Young R.C., Devita V.T., Berard C.W., The Rappaport Classification Of Non Hodgkin Lymphomas: A Closer Look Using Other Proposed Classifications, Semin Oncol (1980) 7,3 234-43.
12. Evans L. S. and Hancock B.W., Non-Hodgkin Lymphoma. Lancet (2003) 362, 139-146.
13. Ansell S. M., Armitage J., Non-Hodgkin Lymphoma: Diagnosis And Treatment, Mayo Clinic Proceedings, (2005) 80,8 1087-1097

14. Stolte M., Bayerdorffer E., Morgner A., Helicobacter And Gastric Malt Lymphoma, Gut, (2002) 50, 19-24
15. Mills S. E., Carter D., Reuter V.E., Greenson J.K., Stoler M.H., Oberman H.A., Edt. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, (2004) 777-848
16. Opelz G., Henderson R., Incidence Of Non-Hodgkin Lymphoma In Kidney And Heart Transplant Recipients, Lancet, (1993) 342, 1514-1516
17. Cote T.R., Biggar R.J., Rosenberg P.S., AIDS/Cancer Study Group. Non- Hodgkin's Lymphoma Among People With AIDS: Incidence, Presentation And Public Health Burden, Intjcancer (1997) 73, 645-650
18. Richardson M.E., Chen Q.G., Filippa D.A., Intermediate-To High-Grade Histology Of 54 Lymphomas Carrying t(14;18) Is Associated With Additional Nonrandom Chromosome Changes, Blood, (1987) 70, 444-447
19. Winter J.N., Andersen J., Variakojis D., Gordon L.I., Prognostic Implications Of Ploidy And Proliferative Activity In The Diffuse, Aggressive Non-Hodgkin's Lymphomas, Blood, (1996) 88, 3919-3925
20. Yunis J.J., Frizzera G., Oken M.M., Mckenna J., Multiple Recurrent Genomic Defects In Follicular Lymphoma: A Possible Model For Cancer, N Engl J Med, (1987) 316, 79-84
21. Dominis M., Dzebro S., Gasparov S., Pesut A., Kusec R., Diffuse Large B-Cell Lymphoma And Its Variants, Croat Med J, (2002) 43, 535-40
22. T.C Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2010
23. Paydaş S. Gelişmekte Olan Ülkelerde Lenfoma Epidemiyolojisi. 2004 XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi
24. Müller A.M., Ihorst G., Mertelsmann R., Engelhardt M., Epidemiology Of Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL): Trends, Geographic Distribution, And Etiology, Ann Hematol (2005) 84,1 1-12
25. Hunt K.E., Reichard K.K., Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Arch Pathol Lab Med ,(2008) 132, 118-24
26. Tondini C., Zanini M., Lombardi F., 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, 720-25
27. Lichtman M.A., The Non-Hodgkin Lymphomas. Williams Hematology, 8th Ed., 1407-1459. New York: Mcgraw-Hill (2011)

28. Groves F., Linet M.S., Travis L.B., Devesa S.S., Cancer Surveillance Series: Non-Hodgkin's lymphoma Incidence By Histologic Subtype In The United States From 1978 Through 1995. *J Natl Cancer Inst* (2000) 92, 1240
29. Moller M.B., Pedersen N.T., Christensen B.E., Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Clinical Implications Of Extranodal Versus Nodal Presentation--A Population-Based Study Of 1575 Cases. *Br J Haematol* (2004) 124:151
30. Ansell S.M., Armitage J., Non-Hodgkin Lymphoma Diagnosis And Treatment. *Mayo Clin Proc.* August (2005) 80, 8, 1087-1097
31. Jonathan Said. Diffuse Aggressive B-Cell Lymphomas. *Adv Anatol Pathol*, (2009) 16, 216-235
32. Greer J.P., Williams M.E., Non-Hodgkin Lymphoma In Adults. *Wintrobe's Clinical Hematology*, 12th Ed. (2009) 2144–2194, Philadelphia
33. Berglund M. Chromosomal Imbalances In Diffuse Large B-Cell Lymphoma Detected By Comparative Genomic Hybridization. *Mod Pathol* (2002) 15, 807–817
34. Pasqualucci L. Inactivation Of The PRDM1/BLIMP1 Gene In Diffuse Large B Cell Lymphoma, *J Exp Med*, (2006) 203:311-7
35. Skibola C.F., Genetic Susceptibility To Lymphoma, *Haematologica* (2007) 92, 960–969
36. Hunt K.E., Reichard K.K., Diffuse Large B-Cell Lymphoma, *Arch Pathol Lab Med* (2008) 132, 118-24
37. Gurbaxani S., Anastasi J., Hyjek E., Diffuse Large B-Cell Lymphoma—More Than A Diffuse Collection Of Large B Cells: An Entity In Search Of A Meaningful Classification, *Arch Pathol Lab Med* (2009) 133, 1121–1134
38. Hans C.P., Weisenburger D.D., Greiner T.C., Confirmation Of The Molecular Classification Of Diffuse Large B-Cell Lymphoma By Immunohistochemistry Using A Tissue Microarray, *Blood* (2004) 103,1 275-282
39. Lin P., Medeiros J., High-Grade B-Cell Lymphoma/Leukemia Associated With T(14;18) And 8q24/Myc Rearrangement: A Neoplasm Of Germinal Center Immunophenotype With Poor Prognosis. *Haematologica* (2007) 92,10 1297-301
40. Snuderl M., Kolman O.K., Chen Y., B-Cell Lymphomas With Concurrent Igh-Bcl2 And Myc Rearrangements Are Aggressive Neoplasms With Clinical And Pathologic Features Distinct From Burkitt Lymphoma And Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol*, (2010) 34,3 327–340
41. Aukema M., Siebert R., Schuurin E., Double Hit B-Cell Lymphomas, *Blood* (2011), 117 2319-2331

42. Tilly H., Lepage E., Coiffier B., Blanc M., Herbrecht R., Bosly A., Et Al, Intensive Conventional Chemotherapy (ACVBP Regimen) Compared With Standard CHOP For Poor-Prognosis Aggressive Non-Hodgkin Lymphoma, *Blood* (2003) 102, 4284-9
43. Sanya Sukpanichnant, Tawatchai Pongpruttipan. Commentary On The Who Classification (2008) Of Malignant Lymphoma, *Siriraj Med J* (2009) 61, 154-159
44. Carbone P.P., Report Of The Committee On Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res.* (1971) 31, 1860-1861
45. Uherova P.I., Ross C.W., Schnitzer B., Singleton T.P., Finn W.G., The Clinical Significance Of CD10 Antigen Expression In Diffuse Large B-Cell Lymphoma, *Am J Clin Pathol* (2001)
46. Brunangelo Falini and David Y. Mason. Proteins Encoded By Genes Involved In Chromosomal Alterations In Lymphoma And Leukemia: Clinical Value Of Their Detection By Immunocytochemistry. *Bloodjournal* (2002) 99-2
47. Noronha V. Primary Non-Hodgkin's Lymphoma Of The Liver, *Crit Rev Oncol Hematol*, (2005) 53, 199-207
48. Hausdorff J., Non-Hodgkin's Lymphoma Of The Paranasal Sinuses: Clinical And Pathological Features, And Response To Combined-Modality Therapy, *Cancer J Sci Am*, (1997) 3, 303-11
49. Herman T.S., Involvement Of The Central Nervous System By Non-Hodgkin's Lymphoma: The Southwest Oncology Group Experience, *Cancer* (1979) 43, 390
50. Recht L., Straus D.J., Cirrincione C., Thaler H.T., Posner J.B., Central Nervous System Metastasis From Non-Hodgkin's Lymphoma: Treatment And Prophylaxis, *Am J Med*, (1988) 84, 425.
51. Mackintosh F.R., Colby T.V., Podolsky W.J., Burke J.S., Hoppe R.T., Rosenfelt F.P. et al. Central Nervous System Involvement In Non-Hodgkin's Lymphoma: An Analysis Of 105 Cases. *Cancer* 1982; 49: 586
52. El-Helw L., Goodwin S., Slater D., Hancock B.W., Primary B-Cell Lymphoma Of The Skin. The Sheffield Lymphoma Group Experience (1984-2003). *Int J Oncol.* 2004; 25: 1453-8
53. Meunier J., Lumbroso-Le Rouic L., Vincent-Solomon A., Dendale R., Asselain B., Ophthalmologic And Intraocular Non-Hodgkin's Lymphoma: A Large Single Centre Study Of Initial Characteristics, Natural History, And Prognostic Factors. *Hematol Oncol*, (2004) 22, 143-58
54. Maruyama D., Watanabe T., Beppu Y., Kobayashi Y., Kim S.Y., Tanimoto K. et al. Primary Bone Lymphoma: A New And Detailed Characterization Of 28 Patients In A Single-Institution Study. *JPN J Clin Oncol* (2007) 37, 216-23.

55. Abbondanzo SI, Seidman JD, Lefkowitz M, Tavassoli FA, Krishnan J. Primary Diffuse Large B-Cell Lymphoma Of The Breast. A Clinicopathologic Study Of 31 Cases, *Pathol Res Pract.* (1996), 192, 37-43
56. Cadranet J, Wislez M, Antoine M. Primary Pulmonary Lymphoma *Eur Respir J.* (2002), 20, 750-762
57. Nascimento AF, Winters GL, Pinkus GS. Primary Cardiac Lymphoma: Clinical, Histologic, Immunophenotypic, And Genotypic Features Of 5 Cases Of A Rare Disorder. *Am J Surg Pathol.* (2007) 31, 1344-50
58. Jonathan Said. Diffuse Aggressive B-Cell Lymphomas. *Adv Anatol Pathol.* (2009) 16, 216- 235
59. Colomo L., Lopez-Guillermo A., Perales M., Rives S., Martinez A., Bosch F., Clinical Impact Of The Differentiation Profile Assessed By Immunophenotyping In Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma, *Blood* (2003) 101, 78-84
60. Kennedy G.A., Cull G., Gill D., Marlton P., Norris D., Cobcroft R., Identification Of Tumours With The CD43 Only Phenotype During The Investigation Of Suspected Lymphoma: A Heterogeneous Group Not Necessarily Of T Cell Origin, *Pathology* (2002) 34, 46-50
61. Fisher R.I., Miller T.P., O'Connor O.A., Diffuse Aggressive Lymphoma. *American Society Of Hematology* (2004) 221-236
62. Bea S., Colomo L., López-Guillermo A., Salaverria I., Puig X., Pinyol M. et al. Significance And Prognostic Value Of Chromosomal Imbalances In Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *J Clin Oncol* (2004) 22, 3498-3506
63. Lossos I.S., Morgensztern D., Prognostic Biomarkers In Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* (2006) 24, 995-1007
64. Prosnitz L., Mauch P., Non-Hodgkin's Lymphoma. In: Perez C, Brady L, Halperin E, Schmidt-Ulrich R, Editors. *Principles And Practise Of Radiation Oncology.* 4th Ed. Philadelphia, Lippincott, Williams&Wilkins (2004), 2064-6
65. Fisher R.I., Gaynor E.R., Dahlberg S., Oken M.M., Grogan T.M., Mize E.M. et al. Comparison Of A Standard Regimen (CHOP) With Three Intensive Chemotherapy Regimens For Advanced Non-Hodgkin's Lymphoma, *N Engl J Med* (1993), 328, 1002-6
66. Pfreundschuh M., Trümper L., Klöss M., Schmits R., Feller A.C., Rudolph C. et al. Two-Weekly Or 3-Weekly CHOP Chemotherapy With Or Without Etoposide For The Treatment Of Young Patients With Good-Prognosis (Normal LDH) Aggressive Lymphomas. Results Of The NHL-B1 Trial Of The DSHNHL. *Blood* (2004) 104, 626- 33

67. Coiffier B., Lepage E., Brière J., Herbrecht R., Tilly H., Bouabdallah R. et al. CHOP Chemotherapy Plus Rituximab Compared With CHOP Alone In Elderly Patients With Diffuse Large-B-Cell Lymphoma, *N Engl J Med* (2002), 346, 235-42
68. Niitsu N., Current Treatment Strategy Of Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Int J Hematol* (2010), 92, 231–37
69. Sehn L.H., Donaldson J., Chhanabhai M., Fitzgerald C., Gill K., Klasa R. et al. Introduction Of Combined Chop Plus Rituximab Therapy Dramatically Improved Outcome Of Diffuse Large B-Cell Lymphoma In British Columbia, *J Clin Oncol* (2005), 23, 5027-33
70. Armigate J.O., My Treatment Approach To Patients With Difuse Large B Cell Lymphoma. *Mayo Clin Proc.* (2012), 87,2
71. Clark H.M., Jones D.B., Wright D.H., Cytogenetic And Molecular Studies Of T(14;18) And T(14;19) In Nodal And Extranodal B-Cell Lymphoma. *Journal Of Pathology* (1992), 166, 129-137.
72. Haarer C.F.L. , Roberts R.A., Frutiger Y.M., Grogan T.M., Rimsza L.M., Immunohistochemical Classification Of De Novo, Transformed, And Relapsed Diffuse Large B Cell Lymphoma Intogermlinal Center Cell And Nongermlinal Center Bcell Subtypes Correlates With Gene Expression Profile And Patientsurvival, *Arch Pathol Lab Med.* (2006), 130, 12, 1819-24.
73. Barrans S.L., Carter I., Owen R.G., Davies F.E., Patmore R.D., Haynes A.P. et al, Germinal Center Phenotype And Bcl-2 Expression Combined With The International Prognostic Index Improves Patient Risk Stratification In Diffuse Large B-Cell Lymphoma, *Blood* (2002), 99, 1136-43.
74. Castillo J.J., Beltran B.E., Song M.K., Ilic I., Leppa S., Nurmi H. et al, The Hans Algorithm Is Not Prognostic In Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With R-CHOP. *Leuk Res.*, (2012) 36, 413-7.
75. Bret C. , Klein B. , Moreaux J., Gene Expression-Based Risk Score In Diffuse Large B Cell Lymphoma, *Oncotarget* (2012)
76. Jazirehi A.R., Huerta-Yopez S., Cheng G., Bonavida B., Rituximab (Chimeric Anti-CD20 Monoclonal Antibody) Inhibits The Constitutive Nuclear Factor- $\{\text{Kappa}\}$ B Signaling Pathway In Non-Hodgkin's Lymphoma B-Cell Lines: Role In Sensitization, *Cancer Res.*, (2005) 65,264-76
77. Fu K., Weisenburger D.D., Choi W.W., Perry K.D., Smith L.M., Shi X., Addition Of Rituximab To Standard Chemotherapy Improves The Survival Of Both The Germinal Center B-Cell-Like And Non-Germinal Center B-Cell-Like Subtypes Of Diffuse Large B-Cell Lymphoma, *J Clin Oncol* (2008) 26, 4587-94.

78. Li Y., Yimamu M., Wang X., Zhang X., Mao M., Fu L. et al, Addition Of Rituximab To a CEOP Regimen Improved The Outcome In The Treatment Of Non-Germinal Center Immunphenotype Diffuse Large B Cell Lymphoma Cells With High Bcl-2 Expression, *Int J Hematol* (2014) 99, 79-86
79. Visco C., Tzankov A., Zijun Y., Xu-Monette, Miranda RN, Tai YC, Yan Li et al. Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Of Germinal Center Origin With Bcl-2 Translocations Have Poor Outcome, Irrespective Of Myc Status: A Report From An International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study, *Haematologica* (2013), 98, 2
80. Johnson N.A., Savage K.J., Ludkovski O., Ben-Neriah S., Woods R., Steidl C et al. Lymphomas With Concurrent Bcl2 And Myc Translocations: The Critical Factors Associated With Survival, *Blood* (2009) 114, 2273– 2279.
81. Luo D.L, Liu Y.H., Zhang F, Xu F.P., Yan L.X., Chen J et al, B-Cell Lymphomas With Concurrent Myc And Bcl-2/Igh Or Bcl-6 Translocations, *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* (2013) 42, 9, 584-8
82. Akyurek N., Uner A., Benekli M., Barista I., Prognostic Significance Of Myc, Bcl2, And Bcl6 Rearrangements In Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, And Prednisone Plus Rituximab, *Cancer* (2012) 118, 4173–4183.
83. Landsburg D.J., Nasta S.D., Svoboda J., Morrissette J.J., Schuster S.J., ‘Double-Hit’ Cytogenetic Status May Not Be Predicted By Baseline Clinicopathological Characteristics And Is Highly Associated With Overall Survival In B Cell Lymphoma Patients. *Br J Haematol.* 2014 Aug; 166(3): 369-74.
84. Cohen JB, Geyer SM, Lozanski G, Zhao W, Heerema NA, Hall NC Et al. Complete Response To Induction Therapy In Patients With Myc-Positive And Double-Hit Non-Hodgkin Lymphoma Is associated With Prolonged Progression-Free Survival. *Cancer.* 2014 Jun 1;120(11):1677-85
85. Hu S , Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A Et al. Myc/Bcl-2 Protein Co-Expression Contributes To The Inferior Survival Of Activated B-Cell Subtype Of Diffuse Large B Cell Lymphoma And Demonstrates High-Risk Gene Expression Signatures: A Report From The International DLBCL Rituximab-CHOP. *Blood* 2013; May 16; 121(20): 4021-31
86. Kobayashi T, Tsutsumi Y, Sakamoto N, Nagoshi H, Yamamoto-Sugitani M, Shimura Y et al. Double-Hit Lymphomas Constitute A Highly Aggressive Subgroup In Diffuse Large B-Cell lymphomas In The Era Of Rituximab. *Jpn J Clin Oncol.* 2012 Nov; 42(11): 1035-42
87. Perry AM, Alvarado-Bernal Y, Laurini JA, Smith LM, Slack GW, Tan KL et al. Myc And Bcl2 Protein Expression Predicts Survival In Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Rituximab. *Br J Haematol.* 2014 May; 165(3): 382-91.

88. Liu L, Cao F, Wang S, Zhou J, Yang G, Wang C. Detection Of Malignant B Lymphocytes By Pcr Clonality Assay Using Direct Lysis Of Cerebrospinal Fluid And Low Volume Specimens. *Int J Lab Hematol* 2014 May.
89. Green TM, Nielsen O, De Stricker K, Xu-Monette ZY, Young KH, Moller MB. High Levels Of Nuclear Myc Protein Predict The Presence Of Myc Rearrangement In Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2012 Apr.