

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Patoloji Anabilim Dalı

KLASİK HODGKİN LENFOMADA CD68 VE CD163 İLE
BELİRLENEN TÜMÖR- İLİŞKİN MAKROFAJ
YOĞUNLUĞUNUN LATENT EBV ENFEKSİYONUYLA VE
PROGNOZLA İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hanife Seda Mavili

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Aydın İşisağ

Manisa, 2017

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi, birikim ve tecrübeleriyle bana yol gösterici ve destek olan tez danışmanım Prof. Dr. Aydın İşisağ'a, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve vurguladığı her bilginin meslek hayatımdaki değerini unutmayacağım Prof. Dr. Ali Rıza Kandiloğlu'na, bilgisi, enerjisi ve titizliğiyle bana çok şey katan ve bilgi aktarımına hayran olduğum Prof. Dr. Semin Ayhan'a, şefkati, bilgisi, deneyimleri ve öğretmedeki sabrıyla kendisinden çok şey öğrendiğim Prof. Dr. Peyker Temiz'e, öğretmedeki ustalığıyla ve bilgisiyle bana çok şey öğreten ve eğitimime katkılarını her zaman hatırlayacağım Prof. Dr. Nalan Neşe'ye, neşesi ve çalışkanlığıyla örnek bir tablo oluşturan Uzm. Dr. Ayça Tan'a, tezimin istatistiksel değerlendirilmesinde emeği geçen Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Erhan Eser'e, tezimde hasta verilerinin edinilmesine yardımcı olan Dr. Lale Saka Baraz'a, birlikte çalışmaktan büyük zevk duyduğum, asistanlık hayatımda önemli, güzel dostluklar edindiğim asistan arkadaşlarıma, eğitim sürecindeki yardımlarından dolayı teknisyen ve arşiv çalışanlarına, tezimin kesit ve boya işlemleriyle ilgilenen Sadık Kaplan'a ve bu süreçte yardımcı olan Ahmet Karakaya'ya ve Melek Türkdal'a, tüm eğitim hayatım boyunca bana destek veren ve haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim aileme ve yanımda olmasından güç aldığım, her zaman desteğini hissettiğim sevgili eşime teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Hanife Seda Mavili

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ.....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	3
Hodgkin Lenfoma.....	3
Tarihçe.....	3
Epidemiyoloji.....	3
Etiyoloji.....	4
Genetik faktörler.....	4
Çevre.....	5
Epstein-Barr virüs.....	5
İmmünsüpresyon.....	7
Diğer faktörler.....	7
Hodgkin lenfomada neoplastik (HRS) hücreler.....	7
HRS hücrelerinin histopatolojisi.....	7
HRS hücrelerinin kökeni.....	8
HRS hücrelerinde B hücre fenotipinin kaybı.....	9
HRS hücrelerindeki somatik genetik mutasyonlar ve sinyal yolaklarının deregülasyonu.....	10
HRS hücreleri ile çevresel etkileşim.....	12
HRS hücrelerinin immunfenotip.....	13
Hodgkin lenfomanın histopatolojik sınıflandırılması.....	13
Nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfoma.....	15
Klasik Hodgkin lenfoma	15
Genel özellikleri.....	15

Histolojik subtipleri.....	16
Hodgkin Lenfomanın Evrelemesi.....	18
Hodgkin Lenfomanın Tedavisi.....	19
Hodgkin Lenfomadaki Prognostik Faktörler.....	20
III. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	24
IV. BULGULAR.....	30
V. TARTIŞMA.....	54
VI. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63
VII. ÖZET.....	66
VIII. İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT).....	68
IX. KAYNAKLAR.....	70

KISALTMALAR

AIDS.....	Edinilmiş immün yetmezlik sendromu
CISH.....	Kromojen in situ hibridizasyon
DSÖ.....	Dünya Sağlık Örgütü
EBER.....	Epstein-Barr virüs encoded Ribonükleotid asit
EBV.....	Epstein-Barr virüs
EORTC.....	Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Organizasyonu
GHSB.....	Alman Hodgkin Çalışma Grubu
HIV.....	İnsan immün yetmezlik virüsü
HL.....	Hodgkin Lenfoma
HLA.....	Human Lökosit Antijen
HRS.....	Hodgkin/Reed Sternberg
Ig.....	İmmunglobülin
IPS.....	Uluslararası Prognostik Skor
KHL.....	Klasik Hodgkin Lenfoma
LMP-1.....	Latent Membran Proteini-1
MS.....	Mikst Sellüler
NCCN.....	Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı
NCIC.....	Kanada Ulusal Kanser Enstitüsü
NF-κB.....	Nükleer faktör kappa-B
NLPHL.....	Nodüler lenfosit predominant Hodgkin Lenfoma
NS.....	Nodüler Sklerozan
NK.....	Natural Killer
PCR.....	Polimeraz zincir reaksiyonu
TAM.....	Tümör ilişkili makrofaj

GİRİŞ

Hodgkin Lenfoma (HL) tüm malignitelerin %0,6'sını, lenfomaların ise %10'unu oluşturmaktadır. HL hem klinik hem de histolojik özellikleri bakımından diğer malignitelerden farklı olup tümör zeminindeki inflamatuvar hücreler yoğun, neoplastik hücreler (Reed-Sternberg ya da Hodgkin hücresi) ise az sayıda bulunmaktadır. Neoplastik hücreler çok sayıda kemokin ve sitokin üreterek bu çevresel ortamı düzenler. CD4 T lenfositler hücre popülasyonunun büyük kısmını oluştururlar. Bunun yanı sıra eozinofiller, mast hücreleri ve makrofajlar da bu çevresel ortamda bulunmaktadır. Son zamanlarda folliküler lenfoma ve klasik Hodgkin lenfoma (KHL) gibi hematolojik malignitelerde bu çevresel ortamın tümör progresyonunda ve prognozda önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir. KHL'da özellikle makrofaj infiltrasyonunun yoğunluğunun prognostik rolüne ilişkin, gen ekspresyon profil analizi ya da immunohistokimyasal yöntemlerle çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların bazılarında makrofaj yoğunluğunun artmasının sağkalımı azalttığı gösterilirken, bir kısmında da sağkalıma etkisi olmadığı belirtilmektedir. Buna ek olarak başka çalışmalarda da tümör-ilişkin makrofaj yoğunluğunun neoplastik hücrelerdeki EBV (+)'liği ile korele olduğu saptanmıştır.

Hodgkin lenfomada prognozu belirleme klinik ve biyokimyasal verilerin yer aldığı Uluslararası Prognostik Skor (IPS) kullanılmaktadır. Ancak buna ek olarak son yıllarda KHL'da tümör-ilişkin makrofaj yoğunluğunun saptanmasının ve EBV (+)'liği ile ilişkisinin gösterilmesinin, prognozu ön görmek yanı sıra hedefe yönelik tedavi açısından da büyük yarar sağlayabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada KHL olgularında CD68 ve CD163 ile tümör-ilişkin makrofaj yoğunluğunu saptamak ve bunun neoplastik hücrelerdeki latent EBV enfeksiyonu ve sağkalım süresiyle olası ilişkilerini ortaya çıkarmak; bu bulguların eşliğinde patoloji raporlarında makrofaj yoğunluğunun vurgulanmasının gerekliliğini araştırmak ve ek olarak da bahsedilen

değişkenlerin Uluslararası Prognostik Skor (IPS), Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Organizasyonu (EORTC) skoru ve klinikopatolojik parametreler ile ilişkisinin olup olmadığını açığa çıkarmak amaçlanmıştır.



GENEL BİLGİLER

Hodgkin Lenfoma:

Tarihçe:

HL en iyi tedavi edilebilen kanserlerden biridir ve adını doktor Thomas Hodgkin'den almaktadır. 1832'de Thomas Hodgkin, otopsi olgularıyla hastalığın bulgularını tanımlamıştır (1). 1865'de hastalık Sir Samuel Wilks tarafından Hodgkin hastalığı olarak adlandırılmıştır (2).1872 ve 1878'de Langhans ve Greenfield tarafından hastalığın histolojik özellikleri tanımlanmıştır. 1898'de Carl Sternberg ve 1902'de Dorothy Reed, Hodgkin hastalığı tanısına esas olan dev hücrelerin sitolojik özelliklerini tanımlamışlardır. Bu dev hücreler Reed-Sternberg (RS) hücreleri olarak adlandırılmıştır. HL'nin infeksiyöz bir hastalık mı yoksa malign bir hastalık mı olduğuna yönelik tartışmalar uzun yıllar sürmüştür (3).1960'larda sitolojik çalışmalarda RS hücrelerinin aneuploid ve klonal olduğu gösterilmesiyle malign olduğu kanıtlanmıştır (4). 1999'da Cossmann ve meslektaşları genomik analizlerle R-S hücrelerinin germinal merkez B lenfositlerinden köken aldığını göstermişlerdir (5).

Epidemiyoloji:

HL, tüm malignitelerin %0,6' sını, lenfomaların ise %10'unu oluşturmaktadır (6). Amerika Birleşik Devletlerinde ve Batı Avrupa'da HL, genç yetişkinlerdeki en sık kanserlerden biridir (7) ve yılda yaşları 15-35 yaş arasında olan 100.000 kişiden 3,5-5'inde görülmektedir (8). Japonya'da HL insidansı yaklaşık olarak 3 kat daha düşüktür (9). Ülkemizde ise HL tüm kanser olgularının %1'ini, tüm lenfoma olgularının ise %30'unu oluşturduğu tahmin edilmektedir (10). HL insidasındaki coğrafik değişimler bu hastalığın gelişimine çevresel ve enfeksiyöz ajanların katkı sağladığı düşüncesini desteklemektedir (11).Ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde HL, çocuklarda nadir iken sıklıkla genç erişkinlerde görülmektedir. Gelişmemiş ülkelerde

sosyoekonomik düzeyi düşük popülasyonda ise HL insidansı çocuklarda daha fazladır (12).

HL bimodal bir yaş dağılım eğrisi göstermektedir. İlki 10-35 yaşlarında, ikincisi ise 54 yaşından sonradır (13). HL erkeklerde kadınlara göre biraz daha fazla görülmekte olup (6) E/K oranı 1.34/1 olarak bildirilmiştir (14). HL'nin nodüler sklerozan (NSHL) ve lenfosit zengin (LZHL) histolojik tipleri daha gençlerde ve daha sık kadınlarda görülmektedir (15). HL'de hayatta kalma süresi devamlı olarak artmakta olup 1976'da 5 yıllık sağkalım %78 iken, 1998'de bu oran %94 olmuştur (16). Bu mortalite oranındaki azalmanın asıl nedeninin tedavide kaydedilen gelişmeler olduğu düşünülmektedir.

HL, edinsel immun yetmezlik sendromlu (AIDS) hastalarda HL gelişme riski diğer insanlara göre 10 kat daha fazladır. Ancak AIDS'li ve transplant alıcı hastalarda non-Hodgkin lenfomaya göre çok daha az oranda görülmektedir (17).

Etiyoloji:

HL'nin patogenezi hakkında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Ancak HL'ye yol açan çeşitli etiyolojik faktörleri ortaya çıkarmaya yönelik çok sayıda kapsamlı çalışmalar yapılmasına rağmen HL'nin etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. HL olgularının ailelerinde ve akrabası olmayan sosyal gruplarında da olgular bildirilmesi genetik ve çeşitli çevresel ajanlara yönelik incelemelere dikkati çekmiştir (14,18).

Genetik Faktörler:

Ailesel ve genetik yatkınlık HL etiyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Bireylerin birinci derecede yakın akrabalarında HL tanısının bulunması hastalığın gelişme riskini 3 kat arttırmaktadır (19,20). HL'de genetik faktörleri araştırmaya yönelik yapılan çalışmalarda 4. kromozomun kısa kolunda D4S394 belirleyicisi ile güçlü; 2. ve 11. kromozomlar ile de zayıf bir bağlantı olduğu gösterilmiş ancak yine de spesifik bir gen tanımlanmamıştır (21). HLA tipi ve HL arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda belli HLA sınıf 1 allellerinin

(A1, B5, B8 ve B18) varlığının HL sıklığını 1,3-1,7 kat arttığı gösterilmiştir (22).

Çevre:

Çocukluk çağı ve genç erişkin yaş grubunda sosyal çevre ve Epstein-Barr virus (EBV) infeksiyonunun HL riskini arttırdığı düşünülmektedir. Genç erişkinlerde, yüksek eğitim düzeyi ve sosyoekonomik duruma sahip bireylerde HL görülme riski 2 kat artmıştır (23). Ancak ileri yaşta sosyoekonomik durumun etiolojide rolü olmadığı düşünülmektedir. EBV infeksiyonu ve HL birlikteğini araştıran çalışmalarda EBV infeksiyonunun HL gelişme riskini arttırdığı gösterilmiştir (24,25).

Epstein-Barr Virüs:

Herpes ailesinin bir üyesi olan EBV, median inkübasyon zamanından (4,1 yıl) sonra EBV pozitif HL gelişme riskini 4 kat arttırmaktadır (25). Yapılan farklı çalışmalarda HL'de neoplastik hücrelerde in situ hibridizasyon yöntemiyle EBV- encoded RNA (EBER) probuyla olgularda %33-61 arasında değişen oranlarda EBV pozitifliği saptanmıştır (26-28). Bu farklılıklar coğrafya ya da popülasyon farklılığından kaynaklanabilir; bununla birlikte tüm çalışmalarda mikst sellüler histolojik tipte en fazla olduğu, ileri evre ve ileri yaş ile de pozitifliğin arttığı belirtilmiştir (26,29). Bazı çalışmalarda belirli Human Lökosit Antijeni (HLA) sınıf I allelerin infeksiyöz mononükleoz insidans ve şiddetini arttırdığı, yine aynı HLA allellerinin (HLA A01) EBV ilişkili HL için risk faktörü olduğunu göstermişlerdir (30,31).

EBV, tüm B hücrelerinde eksprese edilen CD21 molekülü aracılığıyla B hücrelerinin içine girer. Bazı viral genler latent olarak infekte olmuş hücrelerde normal proliferasyon ve sağkalım sinyallerinin düzenini bozmaktadır. EBV genomu tarafından kodlanan bir protein olan Latent Membran Proteini-1 (LMP-1) B hücrelerinde normalde yardımcı T hücresi sinyallerinin ana alıcısı olan CD40 reseptörü tarafından aktive edilen bir sinyal molekülüne bağlanır ve onu aktivite eder (32). LMP-1,CD40'ı taklit ederek EBV ile infekte B hücrelerinde NF-κB ve JAK/STAT sinyal yollarını

aktive eder ve B hücrelerinin sağkalımı ile proliferasyonunu uyarır (33). Belirtilmesi gereken bir nokta, EBV negatif tümörlerde de NF-κB aktivasyonunun gösterilmesidir. Bu durum bazı olgularda NF-κB'nin negatif düzenleyici olan IκB'de edinsel mutasyonlara bağlı olarak görülmektedir (34). Ayrıca LMP-1'in B hücrelerinin sağkalımında ve seleksiyonunda CD40 gibi rol oynayan B hücre antijen reseptörü (BCR) sinyalinin yerini aldığı ve BCR yoksun germinal merkez B hücrelerini apoptozdan kurtararak, ölümsüzleştirdiği düşünülmektedir (35). EBV'nin kodladığı EBV Nükleer Antijeni-1(EBNA-1) proliferasyon hücrede episomal EBV genomun replikasyonu için gereklidir. EBV DNA'sının tüm tümör hücrelerinde aynı şekilde bulunması enfeksiyonun hücrel transformasyondan önce gerçekleştiğini göstermektedir (36)

Poppema ve arkadaşlarının lenf nodunda immunohistokimyasal yöntemle EBNA'yı göstermesi EBV ile HL ilişkisindeki ilk kanıt olmuştur (37). Daha sonraları HL'de EBV, Southern blot analizi ile gösterilmiş ve DNA in situ hibridizasyon yöntemi ile de neoplastik hücrelerde EBV nükleik asitinin bulunduğu doğrulanmıştır (38). Son zamanlarda dokuda EBV saptamaya yönelik EBV LMP-1 için immunohistokimya ve EBER belirlemek için in situ hibridizasyon yöntemleri kullanılmaktadır (39,40). Klasik Hodgkin lenfomada polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile EBV araştırılması önerilmez. Çünkü bu yöntem, enfekte hücrelerin görsel olarak tanınmasına yani pozitifliğin neoplastik hücrede ya da küçük lenfositlerde olduğunun belirlenmesine olanak vermemektedir. Klasik Hodgkin lenfomada, LMP-1 immunohistokimyası ile de hemen hemen benzer sonuçlar elde edilebiliyor olsa da; viral latens döneminde bolca eksprese edilen (yaklaşık 10^6 - 10^7 kopya / hücre), translasyona uğramayan kısa RNA molekülleri olan EBER'in in situ hibridizasyonu, en sensitif yöntem olarak kabul edilmektedir (41).

İmmüsupresyon:

HIV ile infekte hastalarda görülen HL olguların tamamına yakını EBV pozitifdir (42). HIV ile infekte olan ve olmayan HL olgularını EBV pozitifliği açısından karşılaştıran çalışmalarda, HIV ile enfekte hastaların tamamında yüksek oranda (%97) EBV pozitifliği saptanırken HIV ile enfekte olmayan HL olgularının yaklaşık yarısında düşük oranda (%30) EBV pozitifliği gözlenmiştir (43,44) HIV ile infekte hastalarda görülen HL olguları genelde tanı anında ileri evrede olup kötü prognoza sahiptir. Organ transplant alıcılarında beklenen HL oranı % 0,2'dir (45). Post-transplant HL olgularının da hemen hemen tümü EBV pozitifdir.

Diğer Faktörler:

Primer ya da kazanılmış immün yetmezlikli ve kronik inflamatuvar hastalıklar gibi immün aracılı hastalıkların HL riskini arttırdığına yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda sağlıklı bireylere göre romatoid artritli hastalarda HL riskinin 2-5 kat arttığı belirtilmiştir (46). Benzer şekilde sarkoidoz gibi otoimmün hastalığı olan olgularda HL riskinin normal popülasyona göre arttığı öne sürülmektedir (47). Diyabet hastalarında ise HL riskinin azaldığı bulunmuştur (48). Sigara tüketiminin de HL etiyojisinde rolü olduğuna yönelik yapılan çalışmalarda fazla miktarda sigara tüketiminin genç erişkinlerde HL görülme riskini arttırdığı ortaya konmuştur (49). Ancak bahsedilen bu faktörlerin HL ile doğrudan ilişkili olduğunu kanıtlayan yeteri kadar veri bulunmamaktadır.

Hodgkin Lenfomadaki Neoplastik Hücreler (Hodgkin/Reed-Sternberg hücreleri):

Hodgkin/Reed-Sternberg hücrelerinin histopatolojisi:

Diğer tümörlerden farklı olarak HL'de non-neoplastik inflamatuvar hücreler çoğunluktadır ve tümör hücreleri popülasyonun yalnızca %1-3'ünü oluşturur (50). HL'nin patognomik özelliği RS hücreleridir ve HL tanısı için RS hücresi ya da onun lenfosit predominant (LP) veya laküner hücre gibi varyantlarından

biri olması gerekmektedir. Ancak RS hücreleri farklı morfolojik özellikler gösterebilir ve morfolojik olarak benzer hücreler infeksiyöz mononükleoz, toksoplazma lenfadeniti gibi birçok benign durumlarda da görülebilir (51). Dolayısıyla HL tanısı için RS hücrelerinin tipik varyantları dikkate alınmalıdır.

RS hücrelerinin; klasik tipi, Hodgkin hücresi, mummifiye hücre, laküner hücre, anaplastik varyant ve LP hücresi olmak üzere farklı tipleri vardır. Binükleer RS hücreleri “diagnostik” ya da “baykuş gözü” hücreleri olarak adlandırılır. Mononükleer RS hücrelerine ise Hodgkin hücresi denilmektedir. Hodgkin hücrelerinin sitolojik özelliklerini RS hücreleri ile aynı olup hücre kökeni ve fonksiyonları da RS hücreleri ile benzerdir. Apoptotik RS hücrelerine “mumifiye” ya da “zombi” hücreleri de denilmektedir. NSHL tipinde bulunan karakteristik RS hücresi “laküner” hücreleridir (52). RS hücresinin anaplastik varyantı sıklıkla HL'nin lenfositten fakir tipinde (LFHL) görülür. LP ya da “popcorn” hücreleri ise noduler lenfosit predominant HL'nin (NLPHL) karakteristik hücreleridir. Sayılan tüm neoplastik hücreler ise Hodgkin/Reed- Stenberg (HRS) hücreleri olarak adlandırılır.

Hodgkin/Reed Sternberg hücrelerinin kökeni:

HRS hücrelerinin kökeni yıllardır tartışma konusu olmuştur. Farklı zamanlarda bu hücrelerin dendritik hücrelerden, histiosit/makrofaj hücrelerinden ya da aktive T ve B lenfositlerden köken aldığı düşünülmüştür (53, 54). Daha sonraları PCR analizleri ile RS hücrelerinde somatik mutasyonlu Ig zincir gen yeniden düzenlenimin ortaya çıkmasıyla HL'deki RS hücrelerinin germinal merkez B hücre kökenli olduğu gösterilmiştir (55). Normalde matür B hücreleri yardımcı T lenfositler aracılığıyla antijen ile aktive olduktan sonra germinal merkeze girerler; B hücreleri proliferer olur, diferansiyasyona uğrar, Ig genleri sınıf dönüşümü ve somatik hipermutasyon yoluyla daha da modifiye edilirler. Ig V (değişken) geninde nokta mutasyonları, delesyonlar ve duplikasyon meydana gelir. Çoğu mutasyon hücrelerin zararına olur ve apoptoza uğrarlar. Sadece artan mutasyona afinite kazananlar pozitif seleksiyona uğrarlar, seçilirler ve plazma hücreleri ile hafıza B hücreleri oluşur. Bu B hücre gelişimi sırasında, LP hücreleri

mutant pozitif seleksiyona uğramış hücrelerden, HRS hücreleri ise henüz tam net anlaşılamayan antiapoptotik mekanizmalar ya da EBV enfeksiyonu sonucunda apoptozdan kurtulan hücrelerden gelişir (55,56).

Hodgkin/Reed Sternberg hücrelerinde B hücre fenotipinin kaybı:

HRS hücreleri matür B hücrelerinden köken almasına rağmen bu hücrelerde B hücreli lenfomalara özgü olan B hücre gen ekspresyon programında geniş çaplı azalma gösterilmiştir (57). HRS hücrelerindeki B hücre fenotipindeki kayıba yol açan yeniden programlanmayı başlatan olay tam olarak bilinmese de bu duruma yardımcı farklı faktörler tanımlamıştır. HRS hücrelerinde OCT2, PU.1, BOB1 gibi çok sayıda B hücre transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu azalmıştır (58, 59). Bunun yanı sıra HRS hücrelerinde, özellikle T hücre gelişiminde düzenleyici faktör olan NOTCH 1 ve NK hücrelerinin lenfoid prekürsör hücrelerinden gelişimini sağlayan ID2 faktörü başta olmak üzere B hücre genlerini süprese eden diğer hematopoetik hücre dizilerinin regülatörlerinin aberran ekspresyonu gözlenmektedir (60, 61). ID2, önemli bir B hücre transkripsiyon faktörü olan E2A'yi inhibe etmektedir (61,62). Eksprese edilen çok sayıda transkripsiyon faktörleri HRS hücrelerinin fenotipine katkıda bulunmaktadır. İlginç biçimde HRS hücrelerindeki düşük miktarda da olsa PAX5 ekspresyonu ile B hücre kimliğinin sürdürülmesi sağlanmaktadır. Bunun yanı sıra PAX5 aktivitesinin NOTCH1 tarafından inhibe edildiği de düşünülmektedir (63). Normal B hücrelerinde yalnızca bir kısmı bulunan "polycomb grup ailesi 1 ve 2 kompleksinin" çok sayıda öğeleri HRS hücreleri tarafından eksprese edilmektedir. Bu kompleks ve diğer hematopoetik hücre belirteçleri B hücre genlerinin down-regülasyonuna katkıda bulunmaktadır (64,65). Ancak yine de HRS hücrelerindeki B hücre fenotip kaybındaki dönüştürücü olaylar halen tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte bu kaybın HRS hücrelerinin apoptoz öncesi germinal merkez B hücrelerinden gelişmesi ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (57).

Hodgkin/Reed Sternberg hücrelerinde somatik genetik mutasyonlar ve sinyal yollarının deregülasyonu:

HRS hücreleri genellikle multipl kromozomal anormallik gösterirler. Klonal anormallik yanı sıra kromozomal karasızlığı gösteren çok sayıda subklonal aberasyon da içermektedirler (66). Birçok non- Hodgkin B hücreli lenfomanın özelliği olan Ig lokusunu içeren kromozomal translokasyonlar ve buna bağlı onkogenler (BCL1, BCL2, BCL3, BCL6, REL ve MYC gibi) klasik Hogkin lenfomaların yaklaşık %20'sinde bulunmaktadır (67). HRS hücrelerindeki Ig lokuslarındaki "genel sessizleştirme" göz önüne alındığında; Ig lokuslarındaki translokasyonlara bağlı onkogenlerin mi belirli HRS hücre klonlarında bozulmuş ekspresyona yol açtığı sorusunu gündeme getirmiştir. Ancak bunun HL'nin gelişiminin erken dönemlerinde önemli olabileceği ve kazanılmış ek dönüştürücü olayların da bulunması nedeniyle bu düşünce desteklenememiştir.

HRS hücrelerini gelişiminde esas rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'nin patogenezdaki rolünün saptanmasından sonra bu yolaktaki değişimlere yol açan gen mutasyonlarının araştırılması için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Normalde aktive B lenfositlerinde kısa süreliğine olan bu NF- κ B ve JAK/STAT sinyal yollarındaki aktivasyon HRS hücrelerinin patogenezinde temel rol oynamaktadır.

NF- κ B, B lenfositlerin çekirdeğinde bulunan immunglobulin hafif zincirine bağlanan, immün yanıtta yer alan, hücre proliferasyonuna ve apoptoza katılan bir transkripsiyon faktörüdür. Normalde I κ B denen inhibitör sitoplazmik protein ailesine bağlı halde bulunur. Bu bağlanma, NF- κ B'nin çekirdeğe translokasyonuna ve dolayısıyla DNA'ya bağlanmasını engeller.

Doğal ve alternatif olmak üzere iki farklı NF- κ B yolağı tanımlanmıştır. HRS hücreleri ve çevredeki hücrelerin etkileşimi ile sinyal aktivasyonu gerçekleşir. Doğal yolda gelen sinyaller ile I κ B, proteolizle yıkıma uğrar ve NF- κ B'nin serbest kalarak, nükleus içine girmesi sağlanmış olur. HL olgularının yaklaşık %30'unda NF- κ B faktörünü kodlayan REL genomunun amplifikasyonu bulunmaktadır (68,69).

HRS hücrelerinin genom kazanımlarından olan NIK, alternatif NF-κB yolağının pozitif regülatörüdür (70). NF-κB inhibitörü olan IκBα ve IκBε protein ailesini kodlayan genlerde mutasyon olguların %10-20'sinde görülmektedir (71,72). NF-κB aktivasyonunu inhibe eden A20'yi kodlayan, tümör süpresör gen olan TNFAIP3 geninde mutasyon klasik HL olgularının yaklaşık %40'ında gözlenmektedir (73,74). TNFAIP3 geninde mutasyon olan çoğu HL olgusunun EBV negatif olması A20 inaktivasyonu ile EBV enfeksiyonunun farklı durumlarda neoplastik hücre gelişiminde etkili olduğunu akla getirmektedir (74). HRS hücrelerinde NF-κB aktivasyonunda rol oynayan BCL3 ile tümör süpresör gen olan CYLD ve TRAF3 gibi diğer genlerde mutasyon nadir görülmektedir (70,75,76). Sonuçta NF-κB aktivasyon yolağındaki çok sayıdaki genetik mutasyonlar HRS hücrelerinin disregülasyonunda rol oynamaktadır. Bu yolaktaki birden fazla faktörün mutasyonu HRS hücrelerinin yaşamı sürdürmesi ve proliferasyonu için gerekli olan güçlü NF-κB aktivasyonunu edinmesini sağlamaktadır.

HRS hücrelerinde önemli olan diğer bir sinyal yolağı ise JAK/STAT yolağıdır. HRS hücrelerinde IL13 ve IL21 gibi çeşitli sitokinler JAK/STAT sinyal aktivasyonunda rol oynamaktadır (77,78). STAT sinyalini aktive eden JAK2 fonksiyonu kazanımı HL'nin yaklaşık %20'sinde görülmektedir (79,80) STAT aktivasyonun ana inhibitörü olan SOCS1 geninde mutasyon klasik HL olgularının %40'ında belirtilmiştir (81). Bunların dışında HRS hücrelerinde normal B hücrelerinde eksprese edilmeyen çok sayıda tirozin kinaz reseptörün aberan ekspresyonu ve aktivasyonu saptanmıştır (82).

Sonuçta HRS hücrelerinin patogenezinde rol oynayan genetik faktörlerin yalnızca bir kısmının anlaşılması bile genetik mutasyonlardaki heterojeniteyi göstermeye yetmektedir. Bu yollardaki aktivasyonların oluşumunda HRS hücreleri ile çevrede bulunan reaktif hücreleri arasındaki etkileşimin de rolü olduğu düşünülmektedir. Tüm bu özelliklerden dolayı günümüzde HL'de hedefe yönelik tedavide bu sinyal yollarının ve HRS hücreleri ile diğer reaktif hücreler arasındaki iletişimin inhibisyonuna yönelik yeni tedavi stratejileri üzerinde durulmaktadır.

Hodgkin/Reed Sternberg hücreleri ile çevresel etkileşim:

HL'de benign inflamatuvar hücreler çoğunluktadır ve bu hücreler tüm popülasyonun yaklaşık %99'unu oluşturur. HL'de neoplastik hücrelerin çevresinde bulunan reaktif hücreler HL'nin başlangıcında ve progresyonunda hassas bir belirteçtir. Ortamdaki sellüler infiltrat inflamatuvar yanıtta benzer görünümde olup bu CD4 ve CD8 T lenfositler, B lenfositler, nötrofiller, eozinofiller, mast hücreleri, plazma hücreleri ve fibroblastlar HRS hücreleri ile etkileşim halindedirler. CD4 + yardımcı T lenfositler hücre membranında bulunan CD28 ve CD40 ligand ile HRS hücrelerinde bulunan CD80/CD86 ve CD40 reseptörüne bağlanarak aralarında etkileşim sağlar (83,84). CD40 stimülasyonu NF- κ B sinyal yolağının aktivasyonuna yol açar. CD80 ise T ve B hücreleri arasındaki sinyal alışverişinde önemli bir yardımcı uyarıcı faktördür. Diğer faktörler ve hücreler arasındaki bu etkileşim HRS hücrelerini immunolojik ataktan korumaktadır (85). HRS hücreleri çok sayıda kemokin ve sitokin üreterek bu infiltratı düzenler. Yüksek miktarda CCL17 kemokini üreterek yardımcı ve regülatör CD4 T lenfositlerini ortama çeker. CCL5 kemokini ile mast hücre ve eozinofilleri ortama çeker. Eozinofiller ayrıca IL5 ve CCL28 ile de ortama gelir. Bu ortam HRS hücrelerinin proliferasyonuna da katkıda bulunur (86). CD4 T lenfositler KHL'da hücre popülasyonunun büyük kısmını oluştururlar. Bunlar yardımcı ve regülatör T lenfositlerdir. Bunların da çoğu regülatör T lenfositlerdir. Bu hücrelerin ana rolü IL10 üreterek HRS hücrelerini sitotoksik T ve NK hücrelerinden korumaktır (87,88). HRS hücreleri de immunsupresif ortama katkı sağlayan IL10, TGF β , galektin-1 gibi faktörler üretir (89).

Hodgkin/Reed Sternberg hücrelerinin immunfenotipi:

HRS hücrelerine yönelik spesifik tek bir belirleyici yoktur. Klasik HL'da HRS hücrelerinin immunfenotipleri aynıdır. HRS hücreleri CD30, CD15, fascin, CD23, CD4, perforin, TIA-1 ve granzim gibi myeloid, dendritik ya da T hücrelerine ilişkin çeşitli belirleyicileri eksprese ederler. Oysa LCA (CD45) yanı sıra CD20, CD79a, CD19 gibi çoğu B hücre belirleyicilerini eksprese etmezler. Ancak bir B hücre transkripsiyon faktörü olan PAX5'in zayıf ekspresyonu bu hücrelerde her zaman olabilir (90,91). Klasik HL'de B hücre markerlarının ekspresyonu nadiren görülür ve bu olguların primer mediastinel B hücreli lenfoma başta olmak üzere diffüz büyük B hücreli lenfomalar ile ayrımı zorlaşır (92).

Klasik HL'deki HRS hücrelerinin aksine LP hücreleri B hücre belirteçlerini ve OCT2, PU.1, BOB.1 gibi B hücre transkripsiyon faktörlerini eksprese ederler (93,94). Ancak bazı NLPHL olgularında LP hücrelerinin eksprese ettiği B hücre belirteçlerin yoğunluğunun azalabildiği akılda tutulmalıdır (95-97). Özellikle mikst sellüler ve lenfositten yoksun subtipleri başta olmak üzere klasik HL'lerin %30-40'ında HRS hücreleri EBV pozitif iken LP hücreleri asla EBV ile enfekte olmazlar.

Hodgkin lenfomanın histopatolojik sınıflandırılması:

HL'nin klinik ve histolojik özellikleri diğer malignitelerden farklıdır. Non-Hodgkin lenfoma ve diğer malignitelerde malign hücreler baskındır ve tümör sınıflaması hücre kökenine göre yapılır. HL'de ise benign inflamatuvar hücreler çoğunluktadır ve tümör hücreleri popülasyonun %1'inden azını oluşturur. HL sınıflandırılması da HRS hücrelerinin immunomorfolojik özellikleri yanı sıra benign inflamatuvar infiltrata ve fibrozis varlığına göre yapılmaktadır. Non-Hodgkin lenfomada yıllar içinde çok sayıda histopatolojik sınıflama yapılmışken HL'de sınıflama yaklaşık 50 yıldır aynıdır (98).

HL'de ilk kullanılan histolojik sınıflama 1944'te Jackson ve Parker tarafından yapılmıştır. Tablo 1'de gösterildiği gibi bu sınıflamaya göre HL üç

gruba ayrılmaktaydı (99). Bu sınıflama, hastalığın gidişatını belirlemede klinik olarak kullanışlı değildi. Çünkü olguların neredeyse %90'nı klinik ve morfolojik olarak heterojen granülom alt tipinde yer almaktaydı.

1966'da Lukes ve Butler tarafından oluşturulan sınıflamada altı subtip tanımlanmıştır (100). Morfolojik olarak deskriptif altı subtip içeren bu sınıflamanın kullanılması hem klinisyenler hem de patologlar için zor olduğundan bu sınıflama daha sonra Rye konferansında basitleştirilmiştir. Yaklaşık 30 yıl kullanılmış olan bu sınıflamada, lenfosit baskın tip mükemmel prognozu gösterirken lenfositten yoksun tipin daha agresif ve kötü gidişatı gösterdiği belirtilmiştir.

İmmunfenotipik özelliklerin belirlenmesiyle lenfositten baskın tipin diğer klasik formlardan farklı olduğu ve farklı bir klinikopatolojik antite olarak kabul edilmesi gerektiği düşünülmüştür. Bu fikir 1994'te uluslararası bir konferansta ele alınmış olup (101) lenfoid neoplazmların Avrupa- America (REAL) sınıflamasıyla revize edilmiştir (102). Daha sonra küçük değişiklikler yapılarak en son oluşturan Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflaması 2008 yılından beri kullanılmaktadır (103).

Tablo 1: Hodgkin lenfoma sınıflamasının tarihçesi

Jakson ve Parker (1944)	Lukes ve Butler (1966)	Rye (1966)	REAL/DSÖ (1994,2001,2008)
Paragranülom	Lenfositik/histiositik nodüler	Lenfosit baskın	Nodüler lenfosit predominant HL
	Lenfositik/histiositik diffüz	Lenfosit baskın	Klasik HL
Granülom	Nodüler sklerozan	Nodüler sklerozan	-Lenfositten zengin
	Mikst sellüler	Mikst sellüler	-Nodüler sklerozan
Sarkom	Diffüz fibrozis, retiküler	Lenfositten yoksun	-Mikst sellüler
			-Lenfositten yoksun
Hodgkin Hastalığı			Hodgkin Lenfoma

Nodüler Lenfosit Predominant Hodgkin Lenfoma:

NLPHL, tüm HL olgularının yaklaşık %5'ini oluşturmaktadır (104). NLPHL morfolojik, genotipik ve fenotipik özelliklerinin yanısıra klinik davranışları yönünden klasik HL histolojik alt tiplerinden farklıdır. NLPHL klasik HL'nin aksine unimodal bir yaş dağılımı göstermekte olup en sık 4. dekatta görülür (101). NLPHL sıklıkla lenf nodunu büyüten lokalize bir hastalık olarak ortaya çıkmaktadır. NLPHL en sık servikal olmak üzere aksiller veya inguinal lenf nodunu tutma eğilimindedir. Çoğu olgunun tanı anında evresi I veya II olup olguların %20'sinden azı ileri evre hastadır. İleri evre hastalarda, büyük B hücreli lenfomaya transformasyon açısından dikkatli olunmalıdır (105). NLPHL'de B semptomları nadir olup olguların yaklaşık %10 kadarında izlenebilir (106). Hastalık çok yavaş bir seyir göstermektedir ve son derece olumlu bir prognoza sahiptir. Geç relaps, yüksek oranda görülmekle birlikte, genellikle tedaviye iyi yanıt vermektedir. NLPHL, tek bir lenf noduna sınırlı olduğu durumlarda, lenf nodu çıkarıldıktan sonra ek bir tedavi gerekmeyip "izle ve bekle" yöntemiyle hasta takip edilebilir (101).

NLPHL, neoplastik hücrelerinin KHL gibi germinal merkez B hücre kökenli olması dışında klinik prezantasyonu, immunfenotipik ve morfolojik özellikleri, klinik gidişatı ve inflamatuvar zemini açısından KHL'dan oldukça farklıdır. Tüm bu özellikler NLPHL'nin aslında B hücreli bir non-Hodgkin lenfoma olduğunu düşündürse de NLPHL ile klasik Hodgkin lenfomanın gen ekspresyon analizinde iki antitenin yakından ilişkili olduğu da belirtilmektedir (107).

Klasik Hodgkin Lenfomanın Genel özellikleri:

Klasik HL, tüm HL olgularının %95'ini oluşturmaktadır. Hastaların çoğu lenfadenopati şikayeti ile doktora başvurmaktadır ve lenf nodları genellikle ağrısızdır. HL'nin tüm formlarında en sık servikal, supraklavikular ve mediastinal bölgelerdeki lenf nodları tutulmaktadır (108). HL'de ekstranodal tutulum %10-15 oranında görülmekte olup en sık tutulum yerleri kemik, kemik iliği, akciğer ve karaciğerdir (109). B semptomları; ateş yüksekliği (birbirini

izleyen 3 günde, >38°C), gece terlemesi ve son 6 ayda vücut ağırlığının %10'undan fazla kilo kaybı ile karakterli olup olguların yaklaşık %40'ında görülmektedir (103). IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13, fibroblast büyüme faktörü, TGF, TNF- α gibi bazı sitokinlerin HL'li hastalarda görülen sistemik semptomlara neden oldukları düşünülmektedir. Günümüz tedavi yöntemleri ile klasik tip HL olgularının %85'inden fazlasında kür sağlamak mümkündür.

Klasik Hodgkin Lenfomanın Histopatolojik Subtipleri:

Nodüler Sklerozan Tip:

Nodüler sklerozan (NS) HL, gelişmiş ülkelerde klasik HL'in en sık görülen alt grubudur ve tüm HL olgularının %40-70'ini oluşturmaktadır (110). Genç kadınlarda en sık görülen HL tipi olup genellikle mediastinal ya da servikal lenf nodlarının ya da her iki bölgenin birlikte tutulumu görülmektedir (111).

NSHL tipi için Lukes ve Butler sınıflamasından beri , nodüler patern, kollagen bantlar ve laküner hücreler olmak üzere üç özellik tanımlanmıştır (100). Bir veya daha fazla kollagenöz bant varlığı tanımlayıcıdır. Laküner hücreler NSHL için oldukça karakteristik olup tek tek, küçük agregatlar ya da koheziv kümeler (sinsityal varyant) halinde izlenebilir. Laküner hücre agregatları genellikle histiositlerle karışık halde bulunurlar, nekroz içerebilir ve bazen de granümatöz bir görünüm sergileyebilirler.

Mikst Sellüler Tip:

Mikst sellüler (MS) HL, klasik HL olgularının %20-25'ini oluşturmakta olup gelişmemiş ülkelerde ve HIV/AIDS'li hastalarda görülen en sık HL tipidir. Hastaların çoğu diğer HL tiplerinde olduğu gibi erkektir. Ancak bu tipte bimodal yaş dağılımı yoktur ve en sık 37 yaşında görülmektedir. Olguların çoğu evre III ya da evre IV hastalardır (103).

MS tip, lenf nodunun büyük bir kısmında ya da tümünde diffüz bir tutulum yapmaktadır. Diagnostik RS hücrelerinin en fazla bulunduğu klasik HL tipidir. Bazı olgularda epitelooid histiositlerin küçük granülom yapıları oluşturduğu gözlenebilir. Hem MS hem de NS subtipinde sıklıkla lenf nodunun interfolliküler alanları tutulmaktadır. Bu nedenle interfolliküler alanda histiosit topluluklarının

bulunması HL açısından uyarıcı olmalı ve HRS hücreleri için dikkatli inceleme yapılması gerekmektedir.

Lenfosit Zengin Tip:

Lenfosit zengin tip klasik HL olgularının yaklaşık %5'ini oluşturmaktadır (103). Bu tip klasik HL'nin diğer tiplerinden farklı olarak klinik özellikleri bakımından daha çok NLPHL'ye benzemektedir. Bu olgularda, NLPHL'de olduğu gibi B semptomları yoktur ve iri kitleler görülmez. Ancak lenfosit zengin KHL'daki nüks oranı NLPHL'ye düşüktür. NLPHL olgularında multipl nüks oranı %27 iken bunda %5 civarındadır. Olguların yaklaşık %15'inde mediastinal tutulum görülmekte olup hastaların çoğunun evresi düşüktür (evre I/II) (112).

Lenfosit zengin tip KHL'nin histolojik özellikleri, küçük lenfositlerin oldukça yoğun olması, diğer inflamatuvar hücrelerin az miktarda bulunması ve sıklıkla nodüler büyüme paterni göstermesi ile karakterlidir. Nodüllerde nekroz ve fibrozis gözlenmez. Nodüller NLPHL'ye benzer şekilde manşon zonun ekspansiyonu ile oluşmaktadır. NLPHL'den ayırımında LP hücreleri yerine HRS hücrelerinin bulunması önemlidir.

Lenfosit Fakir Tip:

Lenfosit fakir tip HL olgularının %5'inden azını oluşturmaktadır (113). Bu antitenin insidansı gittikçe azalmaktadır. Çünkü immunohistokimyanın kullanılmasıyla çoğu olgunun büyük hücreli non-Hodgkin lenfoma sınıfında yer aldığı görülmüştür (114). HL'nin en agresif tipi olup hastalık sıklıkla ileri evrede (evre III/IV) tanı alır. Sıklıkla gelişmiş ülkelerde ve HIV/AIDS'li hastalarda görülmektedir (103).

Antite, Lukes ve Butler sınıflamasına göre olan retiküler ve diffüz fibrozis subtiplerini içermektedir (100). Daha sık olan retiküler tip hipersellüler olup yoğun olarak bazıları klasik HRS hücrelerine benzeyen, pleomorfik, büyük hücrelerden oluşur. Oldukça pleomorfik olan bu HRS hücreleri bazen sarkomatöz bir görünüm sergileyebilirler. Lenfosit, eozinofil, histiosit ve plazma hücreleri az sayıdadır. Nekroz sık gözlenmekte olup fibrozis ve fibriler matriks

de bulunabilir. Daha az görülen diffüz fibrozis tipinde ise hiposellüler, amorf eozinofilik materyal bulunan zeminde dağınık fibrozis gözlenmektedir. Yoğun fibroblast bulunur ve az sayıda inflamatuvar hücre içermektedir. HRS hücreleri nadirdir ve nekroz sıklıkla görülür.

Hodgkin Lenfomanın Evrelemesi:

HL'de evreleme prognozu ve tedavi şeklini belirleyen en önemli faktördür. HL için kullanılan standart evreleme sistemi 1989'da Cotswolds buluşmasında modifiye edilen Ann Arbor evreleme sistemidir (115).

Tedaviyi belirlemede en önemli faktör olan hastalığın evrelemesi için; ayrıntılı bir anamnez (B semptomlarının sorgulanması), fizik muayene, kan sayımı, biyokimya testleri (eritrosit sedimentasyon hızı (ESH), serum alkalen fosfataz), düz akciğer grafisi, toraks ve abdomen bilgisayarlı tomografi (BT) görüntülemesi ve kemik iliği biyopsi örneği alınması gerekmektedir. Buna ek olarak evrelemede ve tedaviye yanıtı değerlendirmede pozitron emisyon tomografisi/bilgisayarlı tomografi PET/BT uygulanan hastalarda kemik iliği biyopsi örneğinin alınmamasının hastanın tedavi stratejisini belirlemede önemli bir etki oluşturmadığı gözlenmiştir (116).

Tablo 2: Ann Arbor Evreleme Sistemi Cotswolds Modifikasyonu

Evre	Tanım
I	Bir lenf nodu veya lenfoid yapının tutulumu, örnek: dalak, timus veya Waldeyer halkası (evre I), veya bir ektranodal bölgenin tutulumu (evre IE).
II	Diyafragmanın aynı tarafında iki veya daha fazla lenf bezi bölgesi (evre II) veya ektranodal yapının tutulumu (evre IIE). Tutulan anatomik bölge sayısı rakam ile gösterilmelidir (örnek: II3).
III	Diyafragmanın her iki tarafında iki veya daha fazla lenf bezi bölgesi (evre III), veya lokalize ekstralatenfatik bir bölgenin tutulumu (evre IIIE) ya da dalak (evre IIIs) veya her ikisinin tutulumu (evre IIIES)
IV	Lenf bezi tutulumu olsun ya da olmasın bir veya daha fazla ekstralatenfatik organın difüz tutulumu. Karaciğer veya kemik iliğinin lokalize tutulumu evre IV değerlendirilir.
A: Sistemik semptom yok B: "B semptomu"; Son altı ayda açıklanamayan %10'dan fazla kilo kaybı, açıklanamayan 38°C üzerinde ateş, gece terlemesi	

Hodgkin Lenfomanın Tedavisi:

1940'lı yıllarda hastaların yarısından fazlası tanıdan sonraki 6 ay içerisinde hayatını kaybetmekteydi. Ancak günümüzde uygulanan multimodal kemoterapi ve radyoterapi rejimleri sayesinde olguların %80'inden fazlasında uzun süreli bir sağkalım ve kür sağlamak mümkün olmuştur.

HL tedavisindeki ilerlemelerle birlikte modern tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Günümüzde tutulu lenf noduna radyoterapi ile birlikte doksorubisin, bleomisin, vinblastin ve dakarbazin (ABVD) ile meklorethanamin, doksorubisin, vinblastin, vinkristin, bleomisin ve prednizon (Starnford V) gibi protokoller yanı sıra daha yakın zamanda kullanılmaya başlayan artırılmış doz bleomisin, etopozid, doksorubisin, siklofosfomid, vinkristin, prokarbazin ve prednizon (BEACOPP) protokolü gibi kombinasyon kemoterapi rejimleri ve tedavi modaliteleri birlikte uygulanmaktadır. Uygulanacak tedavi rejimleri ve kür sayısı hastalığın evresi ve prognostik faktörler göz önüne alınarak belirlenmektedir. HL radyoterapiye duyarlı olup erken evre hastaların büyük bir kısmında orta dozda komplet remisyon sağlanabilmektedir. İleri evre hastalarda kemoterapi ve radyoterapi kombine tedavisi uygulanmaktadır. Primer progresif hastalıkta ve erken dönem nüks varlığında yüksek doz kemoterapi ile birlikte olog kemik iliği transplantasyonu başarılı bir şekilde yapılmaktadır. (117-122).

ABVD rejimi kemoterapi gereken erişkin hastalar için ilk tercihtir. ABVD rejimi diğer erişkin kombinasyonlarına göre daha az lösemi veya infertilite riskine sahiptir. BEACOPP, iyi bir kür oranı sağlar fakat lösemi ve diğer ikincil kanser riski daha fazladır. Bununla birlikte terapilere bağlı geç dönem komplikasyonların (radyoterapiye bağlı oluşan tiroidal, kardiovasküler ve pulmoner disfonksiyon; kemoterapiye bağlı gonadal disfonksiyon ile akut myeloid lösemi, non-Hodgkin lenfoma ve solid tümörler gibi sekonder maligniteler) oluşumunu azaltmak hedeflenmiştir (120,122). Daha az toksik ve başarılı kemoterapi rejimleri belirlemek için hedefe yönelik tedavi protokolleri geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bunlardan biri olan rituximab (anti CD20 antikoru) kullanımıyla progresif hastalıklarda hastaların yüksek doz

kemoterapi etkisine maruz kalması engellenmiştir (117-122). Son zamanlarda inatçı olgularda CD30 antijenine yönelik immunotoksik ya da radyoaktif madde ile işaretli antikolar denenmesi umut verici olmuştur (123).

Hodgkin Lenfomadaki Prognostik Faktörler:

KHL'de tedavi stratejisini belirlemede prognostik belirteçler önem taşımaktadır. Bu nedenle prognostik faktörlerin ve risk gruplarının belirlenmesi için bugüne kadar farklı gruplar oluşturulmuştur. Erken evre (evre I ve II) KHL hastalarında Alman Hodgkin Çalışma Grubu (GHSG), Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Organizasyonu (EORTC), Kanada Ulusal Kanser Enstitüsü (NCIC), Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN) gibi gruplar tarafından çeşitli prognostik faktörler geliştirilmiştir. Bu prognostik faktörler birbirleri ile benzer olup Tablo 3'de gösterilmektedir. Bu kriterlerden en az birinin bulunması kötü prognostik faktör olarak kabul edilmekte ve erken evre KHL olgularında olumsuz gidişatı göstermektedir (124).

1998'de Hasenclever ve arkadaşlarının yayınladıkları çalışma sonucunda ileri evre KHL için prognoz açısından önemli klinik ve laboratuvar parametrelerinden oluşan 7 faktör belirlenmiş olup bunlar uluslararası prognostik skor (IPS) olarak adlandırılmıştır (Tablo 4). Her bir faktör 1 puan olup faktörler arttıkça risk de artmaktadır ve puana göre hafif (0-2 puan), orta (3-4 puan) ve yüksek (5-6 puan) riskli hasta grupları belirlenmektedir. Bu çalışmada sonuç olarak çoklu analizde progresyonsuz sağkalım ve tüm sağkalım oranının 5 puan ve üzerinde sırasıyla %42 ve %56; skor 0'da ise %84 ve %89 olduğu saptanmıştır (125)

Tablo 3: Hodgkin lenfomada prognostik faktörler

Gruplar	Risk Faktörleri						
	Yaş	Histoloji	Sedimentasyon ve B semptomu	Mediastinal kitle	Nodal alan	Ekstranodal lezyon	Kitlesel hastalık
GHSG			>50 mm/s	MMR>0,33	≥ 3	var	
EORTC	≥ 50		veya >30 mm/s + B semptomu	MTR>0,35	≥ 4		
NCIC	≥ 40	MS veya LF	>50 mm/s Veya	MMR>0,33 Veya >10 cm	≥ 4		
NCCN			B semptomu	MMR>0,33	≥ 4		>10 cm

MMR: Mediastinal Kitle Oranı; GHSG: Alman Hodgkin Çalışma Grubu; MTR: Mediasten Toraks Oranı
NCCN: Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı; EORTC: Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Organizasyonu;
NCIC: Kanada Ulusal Kanser Enstitüsü

Tablo 4: Uluslararası prognostik skor (International Prognostic Score; IPS) indeksi (her bir bulgunun varlığı 1 puandır)

Yaş ≥ 45
Erkek cinsiyet
Evre IV hastalık
Hemoglobin < 10,5 g/dl
Serum albumin düzeyi < 4g/dl
Lökosit sayısı ≥ 15000/mm ³
Lenfopeni (Lökosit sayısının %8'inde az ya da mutlak lenfosit sayısı < 600/mm ³)

IPS değerleri günümüzde hala prognostik önemini korumaktadır. Ancak yine de modern tedaviyi yönlendirebilecek belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. IPS'nin yeni biyolojik prognostik faktörler ile birlikte geniş hasta popülasyonunda yeniden değerlendirilmesi risk sınıflamasının oluşturulmasında ve riske bağlı tedavi stratejilerinin uygulanmasında gereklidir. KHL'de mikroçevrede bulunan reaktif hücresel komponentin HRS

hücrelerinin proliferasyonuna ve antiapoptotik özellik kazanmalarına katkıda buldukları netleştikçe biyolojik belirteçlere yönelik çalışmalarda artış gözlenmektedir.

Çeşitli biyolojik belirteçlerin hastalığın gidişatındaki rolünü belirlemek ve hedefe yönelik tedavide gelişmeler sağlamak amacıyla gen ekspresyon profili analizleri ve immunhistokimyasal yöntemlerle çalışmalar yapılmaktadır. 1980'li yıllardan itibaren bu konudaki çalışmalara önem verilmiştir ve ilk olarak KHL olgularına ait doku bloklarında yer aldığı aglutininin bağlanması temel alınarak yapılan çalışmada makrofajlar değerlendirilmiştir. Tümör dokusundaki makrofaj yoğunluğunun B semptomları ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (126). Son zamanlarda gen ekspresyon profili analizi ile HL'de yüzey reseptörleri, intrasellüler protein, sitokinler, genetik anormallikler (amplifikasyon, delesyon, epigenetik sessizlik) ve inflamatuvar hücreler gibi prognostik faktörler tanımlanmıştır. Bu amaçla 2002 yılında yapılan bir çalışmada çevreyle ilişkili genler ile prognoz arasındaki bağlantı öne sürülmüştür (127). Bu çalışmada iyi prognozlu olgularda hücre sinyali ve apoptozu indükleyen genlerde aşırı ekspresyon saptanırken kötü prognozlu olgularda fibroblast aktivasyonu, angiogenezis, ekstrasellüler matriks yeniden düzenlenimi, hücre proliferasyonu ile ilişkili genlerde upregülasyon, tümör süpresör genlerde ise downregülasyon belirlenmiştir. Bu konuda yapılan geniş bir diğer çalışmada KHL olgularında T hücreleri, makrofajlar, plasmaitoid dendritik hücreler, ekstrasellüler matriks, fibroblast fonksiyonu ve B hücrelerinde spesifik popülasyon ile ilişkili gen ekspresyon analizinde iyi ve kötü prognozla ilgili genler tanımlanmıştır (128). Bu çalışma ayrıca HL'de tümör ilişkin makrofaj yoğunluğunun prognostik rolüne ilişkin ilk önemli kanıtlarından biri olmuştur. Farklı çalışmalarda B hücreleri ve apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyonunun iyi prognozla; stromal yeniden düzenlenimi ile ilgili genlerin ekspresyonunun ise kötü prognozla ilişkili olduğu belirtilmiştir (129).

Gen ekspresyon analizinde reaktif inflamatuvar infiltrata ait belirteçlerin pratikte kullanımına yönelik olarak immunohistokimyasal yöntemlerin de birlikte kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Bunlardan, bir B hücre yüzey antijeni olan CD20'yi immunhistokimyasal yöntemle de değerlendiren

çalışmaların bazılarında tümör ile infiltrate alanda inflamatuvar zeminde CD20 pozitif hücrelerin sayısında artışın sağkalımı uzattığı gösterilmiştir (129). İnflamatuvar zemindeki T hücrelerinin sağkalımla ilişkisini inceleyen bir çalışmada regülatör T hücrelerinin (CD4,CD25 ve FOXP3 ekspresyonu) sitotoksik T hücrelerine (TIA-1 ya da granzim B ekspresyonu) oranının hasta sağkalımında bağımsız bir değer olduğu (132) ve FOXP-3+ regülatuvar T hücrelerinin uzamış olaysız ve hastalısız sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (130,131).

Tümör mikroçevresini oluşturan hücrelerden olan makrofajların meme, over, endometrium, kolorektal gibi birçok kanserde tümörün progresyonunu arttırdığı, hücrelerinin invazyonunu, göçünü ve angiogenezisi destekledikleri, tümöre karşı immunsupresif etki oluşturdukları gösterilmiştir (132,133). Hastalık progresyonuna ilişkin benzer etkiler folliküler lenfomada da gözlenmiştir (134). KHL'de de tümör ilişkili makrofaj yoğunluğunun prognoza etkisini araştıran çalışmalarda da makrofaj yoğunluğunun artmasının sağkalım süresini azalttığı ve risk değerlendirilmesinde yeni bir belirteç olabileceği belirtilmektedir (135,136).

HL'de bunların dışında serumda çözünebilir CD30, IL10, TNF alfa ve VEGF düzeyinin artması gibi kötü prognozla ilişkili çeşitli prognostik faktörler de tanımlanmıştır (137,138). Benzer şekilde KHL'de HRS hücrelerinde bcl-2 ekspresyonunun bağımsız bir kötü prognostik belirteç olduğunu belirten çalışmalar da bulunmaktadır (139). Bu biyolojik belirteçler arasında en çok tümörü infiltrate eden makrofajların üzerinde durulmaktadır.

Ancak klinik gidişat ile ilişkili tanımlanan bu belirteçlerin rutin pratikte kullanılma geçmesi için daha geniş verilere gereksinim duyulmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Olgular:

Çalışmamızda, Celal Bayar Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde yer alan ve hastanemizin Hematoloji bölümünde 2008 ve 2016 tarihleri arasında düzenli olarak takibi devam eden 46 KHL olgusu değerlendirildi. Olgulara ait hematoksilen eozin (HE) boyalı preparatlar ve immunohistokimyasal boyalar tekrar değerlendirilerek Dünya Sağlık Örgütü sınıflamasına göre tanılar doğrulandı. Hastaların dosyalarından, klinik gidişi (tanı aldığı andan itibaren yaşam süresi, son durumu vb.), klinik özellikleri ve laboratuvar değerleri (cinsiyet, yaş, hemoglobin, albumin değerleri gibi uluslararası prognostik skor belirteçleri), B semptomları, lezyonun boyutunun ≥ 10 cm (kütleli, "bulky" kitle) olup olmadığı, mediastinal kitle varlığı, Modifiye Ann Arbor sistemine göre hastalığın evresi, tedavisi (kemoterapi, radyoterapi alıp almadığı), nüks ve progresyon olup olmadığı öğrenildi. Hastaların ayrıca uluslararası prognostik skorlama (erkek cinsiyet, yaş ≥ 45 , evre IV, hemoglobin $< 10,5$ g/dl, serum albumin düzeyi < 4 g/dl, lökosit sayısı < 15000 /mm ve Lenfosit sayısı < 600 /mm ya da toplam lökosit sayısının < 8 'i) ile Avrupa kanser araştırma ve tedavi organizasyonuna (EORTC) (yaş ≥ 50 , sedimentasyon > 50 mm/s veya > 30 mm/s + B semptomu, MTR $> 0,35$ ve tutulu nodal alan sayısının ≥ 4 olması) göre risk grupları belirlendi. Her iki skorlama olgu sayısı çok olmadığından tüm evrelerdeki hastalara uygulandı. Uluslararası prognostik skoru 3 ve altında olan hastalar düşük riskli; 4 ve üzerinde olan hastalar yüksek riskli olmak üzere iki kategoriye ayrıldı. EORTC'ye göre ise tanımlanan faktörler yoksa iyi riskli; bunlardan herhangi birisinin olması durumunda ise kötü riskli olmak üzere iki grup oluşturuldu. Hastalara ait preparat ve bloklardan lezyonu temsil eden, en çok doku içeren ve HRS hücrelerinin en çok olanı seçildi. Blok seçiminde nekroz içermeyen alanlar olmasına özen gösterildi. Daha sonra tümör mikroçevresinde bulunan makrofajları değerlendirmek için en sık kullanılan

monosit/makrofaj belirteci olan CD68 antikoruna ile hemen hemen tüm monosit/makrofolarda eksprese edilen ve CD68'e göre daha spesifik bir belirteç olan CD163 antikoruna kullanıldı. CD68 antikorunun PG-M1 klonu yanı sıra, granulositer diziyi ve fibroblastları da boyadığından daha az spesifik olan KP1 klonu olmak üzere iki farklı klonu çalışmaya dahil edildi.

Bu şekilde saptanacak olan tümör-ilişkin makrofaj yoğunluğunun prognozla ve latent EBV enfeksiyonu ile ilişkisi istatistiksel yöntemlerle ortaya konmaya çalışıldı. Ayrıca tümör ilişkili makrofaj yoğunluğu ile IPS, EORTC ve klinikopatolojik parametreler arasında ilişki olup olmadığını da belirlemek amaçlandı.

Tedavi:

Olgulara hastalığın evresi ve hastaların performansına göre çeşitli tedavi protokolleri belirlendiği saptandı. Olguların 44'üne klasik ABVD (doksorubisin, bleomisin, vinblastin ve dakarbazin) tedavi rejimi uygulanmış olup bazılarında ek olarak tümör ile tutulu alana radyoterapi de uygulandı. Kalan iki olgunun performansı düşük olduğundan bu olgulara kemoterapi verilmemiş olup biri tanıdan 2 ay sonra diğeri ise 8 ay sonra ex oldu. Başlangıç tedavisinden sonra nüks ya da progresyon saptanan 18 olgudan 9'una ek olarak DHAP (deksametazon, sitarabin, cisplatin), CEOP (siklofosfamid, etopozid, vinkristin, prednizon), COPP (siklofosfamid, vinkristin, prokarbazin, prednizon) ya da ESHAP (etopozid, metilprednizolon, sitarabin, cisplatin) kemoterapi rejimlerinden biri ya da ikisi uygulandı. Bu hastaların 2'si ilk tanıdan sırasıyla 40 ay ve 50 ay sonra ex oldu. Ek kemoterapi rejimleri uygulanan hastaların 4'üne ve bunların dışında nüks saptanan hastanın 1'ine olmak üzere toplam 5 olguya otolog kemik iliği transplantasyonu (OKİT) yapıldı. Bunların dışında olguların biri tedavi sırasında 6. ayda ex oldu. Bu durumun hastanın yaşlı, ileri evrede olması ve klinik tablosunun kötü olması sonucunda oluştuğu düşünüldü.

İmmunhistokimyasal boyama yöntemi:

Formalin ile tespitli ve parafine gömülü dokulardan elde edilen 3,5 mikron kalınlığındaki kesitler pozitif yüklü elektrostatik lamlara (Isotherm Technical Laboratory Glass Materials) alındı ve 58°C lik etüvde 4 saat tutuldu ve ardından barkodları basılarak çalışmaya hazır hale getirildi. Elde edilen tüm kesitler tam otomatik immunohistokimyasal boyama cihazına (Ventana, Benchmark, XT İHC/İSH) yerleştirildi. İHK boyamaları için cihaz ile uyumlu Ultraview Universal DAB Detection Kit ve EZ prep, LCS, SSC, Cell Condition 1 (CC1), Reaction Buffer Concentrate solüsyonları ile Rabbit Anti-DNP Antibody, Amplifikasyon, ISH proteaz 3, Endogenous Biotin Blocking Kit, Hematoksilen ve Blue Reagent kullanıldı.

Tüm bloklara CD68 KP1 klonu ve PG-M1 klonu ile CD163 immunohistokimyasal boyaları uygulandı. CD68 PG-M1'e yönelik amplifier solüsyonu ile amplifikasyon uygulandı.

İmmunhistokimyasal boyama için CD68 PG-M1 klonu mouse monoklonal antikoru (DAKO, CODE: IS613; Predilüe form, CC1 (EDTA) 60 dakika, inkübasyon süresi 44 dakika, Hemotoksilen 4 dakika, Bluing reagent 4 dakika), CD68 KP1 klonu mouse monoklonal antikoru (VENTANA, Katalog numarası 790-2931; Predilüe form, CC1 (EDTA) 60 dakika, inkübasyon süresi 40 dakika, Hemotoksilen 4 dakika, Bluing reagent 4 dakika), CD163 (MRQ-26 klonu) mouse monoklonal antikoru (VENTANA, Katalog numarası 760-4437; Predilüe form, CC1 (EDTA) 60 dakika, inkübasyon süresi 32 dakika, Hemotoksilen 4 dakika, Bluing reagent 4 dakika) uygulandı.

Cihazda boyama işlemi tamamlandıktan sonra lamalar ılık deterjanlı su ile yıkanıp alkol serilerinden geçirildi. Şeffaflandırma işlemi için ksilolden geçirildi ve Entellan^R (Merck and Co., Berlin) ile kapatıldı.

İn situ hibridizasyon

Çalışmamızda, EBV RNA'yı kromojen in situ hibridizasyon yöntemiyle (CISH) saptamak için EBER (Epstein-Barr virus encoded RNA) probu kullanıldı. Formalin tesbitli, parafine gömülü dokulardan elde edilen 3,5 mikron kalınlığındaki kesitler pozitif yüklü elektrostatik lamlara (Isotherm Technical Laboratory Glass Materials) alındı ve 58°C'lık etüvde ortalama 4 saat parafin eriyinceye kadar tutuldu. Preparatlar tüm İSH işlemleri için tam otomatik immunohistokimyasal boyama cihazına (Ventana, Benchmark XT, IHC/ISH) yerleştirildi. İSH işlemleri için cihaz ile uyumlu EBER 1 DNP Probe, (Regulatory status: ASR; Katalog numarası 760-1209, hücre iyileştirme 60 dakika, İSH proteaz 3 16 dakika, Ultraview İSH Detection Kit, Ultraview Alkaline Phosphatase Red İSH Detection Kit, EZ prep, LCS, SSC, Reaction Buffer Concentrate solüsyonları, Amplifikasyon, Hematoksilen II ve Blue Reagent kullanıldı.

EBV RNA sinyali için ise Ultraview AP Red İSH Kiti ile kırmızı kromojen madde uygulandı. Kaynatma, deparafinizasyon, ön işlem, hibridizasyon, yıkama, sinyal saptama ve arka plan boyama işlemlerinin hepsi tek basamakta tam otomatik cihazda tamamlandı.

Cihazda boyama işlemi tamamlandıktan sonra lamlar ılık deterjanlı su ile yıkayıp alkol serilerinden geçirildi. Şeffaflandırma işlemi için ksilolden geçirildi ve Entellan^R (Merck and Co., Berlin) ile kapatıldı.

İmmunhistokimyasal sonuçların değerlendirilmesi:

Tüm değerlendirmeler standart ışık mikroskopunda yapıldı. Boyanma oranları iki çalışmacı tarafından (A.İ ve H.S.M) konsensusla saptandı.

CD68 (KP1 ve PG-M1 klonu) ve CD163 immunhistokimyasal boyaları ile membranöz ve sitoplazmik boyanma pozitif kabul edildi. Boyanan hücrelerin değerlendirilmesi için HRS hücrelerinin yoğun olduğu ve boyanmanın fazla olduğu alan seçildi. Her üç boyada da değerlendirilen alanların aynı olmasına özen gösterildi. Seçilen alanda x200'lük objektif ile zemindeki non-neoplastik hücreler arasında boyanan makrofajların oranı %5'in katları olarak kantitatif

yöntemle hesaplandı. CD68 KP1 klonu ile arada zayıf boyanan küçük hücreler değerlendirilmeye alınmadı.

İn situ hibridizasyon sonucunun değerlendirilmesi:

Neoplastik hücrelerde EBV varlığı, EBV erken RNA (Epstein-Barr encoded RNA; EBER) probu kullanılarak kromojen in situ hibridizasyon yöntemiyle araştırıldı. EBER pozitifliği için hemen tüm neoplastik hücrelerde nükleer boyanmanın görülmesi gerektiği bildirildiğinden (140), HRS hücrelerinin tamamına yakını nükleer boyandığında EBER pozitif kabul edildi.

İstatistiksel değerlendirme:

Makrofajların sağkalım analizleri ve klinik parametrelerle ilişkisinin belirlenmesi için makrofaj belirteçlerinin ekspresyon düzeyleri açısından literatürde farklı kesme değerleri ("cut-off") kullanıldığı görülmektedir. Bazı çalışmalar kesme değeri olarak makrofaj belirteçlerindeki ekspresyon oranlarının medyan değerini (%25,%30) (141-143), bazıları ise daha önceki yayınlarda belirlenen skorlamayı (<%5, %5-%25, %25-%50, >%50) (144,145) kullanmışlardır. Çalışmaların bazılarında ise daha önceki değerlere göre belirlenen kesme değerinin (%25) sağkalım ile ilişkisinin saptanmaması üzerine istatistiksel farklılık saptayabildikleri değeri (%30) kesme değeri olarak belirlemişlerdir (146). Anlaşılabileceği gibi, bu konuda fikir birliği bulunmamaktadır. Çalışmamızda en yüksek oranda CD 163 ekspresyonu ve daha sonra azalarak sırasıyla CD68 PG-M1 ve CD68 KP1 ekspresyonu görüldüğünden, boyanma yüzdesi medyan değerlere yakın olan %50 CD163 için, %40 CD68 PG-M1 için ve %30 CD68 KP1 için birincil kesme değerleri olarak; daha az ekspresyonun anlamlı olup olmadığını araştırmak için de her üç belirteç için sırasıyla %30, %10 ve %10 oranları ikincil kesme değerleri olarak belirlendi.

Sağkalım analizlerinde genel sağkalımın belirlenmesinde hastalığın tanısı konulduğundan itibaren hastanın herhangi bir nedenle ölümüne ya da en son kayıtlı olan takip anına kadar olan süre; progresyonsuz sağkalımın belirlenmesinde ise hastalığın tanısı konulduğundan itibaren hastalığın

progresyonuna ya da nüksüne kadar ya da en son kayıtlı olan takip anına kadar olan süre dikkate alındı.

Kullanılan makrofaj belirteçlerinin ekspresyon yüzdelerinin belirlenen kesme değerlerine göre klinikopatolojik parametreler, laboratuvar verileri ve EBV varlığıyla ilişkilerinin araştırılmasında Fischer exact test kullanıldı. Tek değişkenli analizde anlamlı çıkan değişkenler çok değişkenli analiz için lojistik regresyon modeline alındı. Sağkalım analizi için Kaplan-Meyer yöntemi ile sağkalım eğrilerinin istatistiksel karşılaştırılması için log-rank testi, boyalar arasındaki korelasyonun araştırılmasında Pearson ve Spearman korelasyon analizi kullanıldı. Sonuçlar $p < 0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı; p değeri 0,05 ile 0,10 arasında ise sınırda anlamlı olarak kabul edildi. Tüm analizlerde SPSS (Statistical Package for Social Sciences) programının 15.0 versiyonu kullanıldı.

BULGULAR

Olguların Yaş, Cinsiyet Dağılımı ve Klinikopatolojik Özellikleri:

Çalışmaya alınan olguların yaş, cinsiyet dağılımı ve klinik özellikleri Tablo 5'de gösterildi. Olguların yarısı kadın, diğer yarısı da erkek hastadan oluştu.

Tablo 5: Olguların klinikopatolojik parametreler, yaş ve cinsiyete göre dağılımı

Özellikler	Olgu sayısı (%)	Özellikler	Olgu sayısı (%)
Yaş		Ekstralenfatik tutulum	
- <50 yaş	31 (67,4)	- Var	20 (43,5)
- ≥50 yaş	15 (32,6)	- Yok	26 (56,5)
Cinsiyet		Dalak Tutulumu	
- Kadın	23 (50)	- Var	16 (34,8)
- Erkek	23 (50)	- Yok	30 (65,2)
B semptom		Sedimentasyon	
- Var	23 (50)	- >50	17 (37)
- Yok	23 (50)	- ≤50	29 (63)
Bulky kitle		Nodal alan sayısı	
- Var	8 (17,4)	- 1-3	20 (43,5)
- Yok	38 (82,6)	- 4-6	12 (26,1)
		- ≥7	14 (30,4)
Mediastinal kitle		Kemik iliği tutulumu	
- Var	5 (10,9)	- Var	12 (26,1)
- Yok	41 (89,1)	- Yok	34 (73,9)

yordu. Olguların yaşları 19 ile 78 arasında değişmekte olup ortanca değeri 43,5'di. B semptomları hastaların %50'sinde, "bulky" kitle %17,4'ünde, ekstralenfatik tutulum %43,5'inde, dalak tutulumu %34,8'inde, kemik iliği tutulumu ise %26,1'inde bulunmaktaydı. Hastaların takip süresi 2 ay ile 89 ay arasında (ortanca: 23,5 ay; ortalama: 30,17 ay) değişmekteydi.

Çalışmaya alınan olguların hastalığın evresi, prognostik grupları ve diğer özellikleri Tablo 6'da gösterildi. Hastaların %60,9'unda takipleri boyunca bir ya da birden fazla progresyon ya da nüks bulunmaktaydı. Olguların %76,1'ine ABVD ± RT uygulanmış olup %19,6'sı bunun yanında daha agresif tedavi protokolleri de aldı. Olguların 2'sine performanslarının düşük olması nedeniyle tedavi verilmedi. Toplam 5 hasta ilk tanılarında sonra sırasıyla 2, 6, 8, 40 ve 50 ay sonra ex oldu.

Tablo 6: Olguların diğer klinikopatolojik parametrelere göre dağılımı

Özellikler	Olgu sayısı (%)	Özellikler	Olgu sayısı (%)
Evre		EORTC	
- Erken (I-II)	18 (39,1)	- İyi risk	11 (23,9)
- İleri (III-IV)	28 (60,9)	- Kötü risk	35 (76,1)
Subtip		Progresyon/nüks	
- NS	22 (47,8)	- Var	18 (39,1)
- MS	17 (37)	- Yok	28 (60,9)
- NOS	7 (15,2)		
IPS		Tedavi	
- 0-3	39 (84,8)	- ABVD	27 (58,7)
- ≥4	7 (15,2)	- ABVD+RT	8 (17,4)
		- ABVD+diğerleri	9 (19,6)
		- Tedavi yok	2 (4,3)

H&E, IHK ve ISH Değerlendirmeleri

Çalışmamızdaki olguların H&E ile boyalı preparatlarından HRS hücrelerinin az, orta ve bol olanlarına ait örnekler sırasıyla Resim 1, Resim 3 ve Resim 5’de, EBER ISH uygulamasına ilişkin H&E ve AP red ile boyalı örnekleri Resim 7 ve Resim 9’da; CD68 KP1, CD69 PG-M1 ve CD163 ekspresyonuna ilişkin örnekler ise Resim 2, Resim 4, Resim 6, Resim 8 ve Resim 10’da sunulmaktadır.

CD68 ile CD163 ekspresyonu:

Her üç belirteçte tümör ilişkili makrofaj yoğunluğu değerlendirilirken genel olarak en fazla boyanma yoğunluğunun CD163’te, en az boyanma yoğunluğunun ise CD68 KP1 klonunda olduğu görüldü. Ancak her üç belirteçte değerlendirilen boyanma yoğunluğu istatistiksel olarak da birbiriyle korelasyon göstermekteydi ($p < 0,001$).

Boyanmanın neoplastik hücrelerin bol olduğu yerde daha yoğun olduğu gözlemlendi. Ancak bu boyanma paterninin CD163’te diğerlerine göre daha belirgin olduğu izlendi. Her üç monosit/ makrofaj belirtecindeki boyanma yüzdesinin ortalama ve ortanca değeri, mikst sellüler subtipde nodüler sklerozan subtipde göre daha yüksekti.

CD68, CD163 Ekspresyonu ve EBV ile Sağkalım İlişkisi:

Çalışmamızda, %40 kesme noktasına göre, CD68 PG-M1 ekspresyonu arttıkça genel sağkalımın (overall survival) azaldığı saptandı. CD68 PG-M1 ile boyanmanın %40’ın üzerinde olduğu olgularda ortalama sağkalım 58 ay iken; boyanmanın %40 ve altında olduğu olgularda ise 85 ay olduğu gözlemlendi . Diğer iki belirleyiciyle ve EBV ile genel sağkalım arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi (Tablo 7).

Tablo 7: Farklı kesme değerlerine göre belirteçlerle genel sağkalım arasındaki ilişki

Belirteçler	Olgu sayısı	Genel sağkalım (ortalama ay)	Genel sağkalım p değeri *
CD68 PG-M1 >%40; ≤%40 >%10; ≤%10	18; 28 38; 8	58; 85	0,047 0,293
CD68 KP1 >%30; ≤%30 >%10; ≤%10	12; 34 30; 16	43; 79	0,300 0,127
CD163 >%50; ≤%50 >%30; ≤%30	12; 34 22; 24	75; 75 70; 76	0,990 0,127
EBER Var Yok	27 19	73 74	0,304

(*log rank)

Progresyonsuz sağkalım ile tümör ilişkili makrofaj yoğunluğu arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Ancak EBV varlığı ve yokluğu ile progresyonsuz sağkalım arasında sınırda anlamlılık gözlemlendi. EBV varlığında progresyonsuz sağkalımın daha uzun olduğu izlendi (Tablo 8).

Tablo 8: Farklı kesme değerlerine göre belirteçlerle progresyonsuz sağkalım arasındaki ilişki

Boyalar	Olgu Sayısı	Progresyonsuz sağkalım (ortalama ay)	Progresyonsuz sağkalım p değeri *
CD68 PG-M1 >%40; ≤%40 >%10; ≤%10	18; 28 38; 8	46; 52 55; 29	0,834 0,205
CD68 KP1 >%30; ≤%30 >%10; ≤%10	12; 34 30; 16	32; 51 57; 32	0,947 0,124
CD163 >%50; ≤%50 >%30; ≤%30	12; 34 22; 24	49; 50 57; 41	0,881 0,412
EBER Var Yok	27 19	61 36	0,062

(*log rank)

Yaş, Cinsiyet Dağılımının ve Klinikopatolojik Parametrelerin Sağkalım ile İlişkisi:

Çalışmamızda beklendiği gibi uluslararası prognostik skorun (IPS) 4 ve üzerinde olmasıyla genel sağkalım süresinin belirgin olarak azaldığı görüldü ($p=0,013$). Bunun yanı sıra hastalığın ileri evrede olması, ekstralenfatik tutulumun bulunması, sedimentasyonun 50 üzerinde olması ve olguların EORTC'ye göre kötü risk grubunda yer almasının genel sağkalımı azalttığına yönelik sınırdan anlamlılık gözlemlendi. Tablo 9'daki verilere ek olarak hastalıkta progresyon ya da nüks izlenmesinin genel sağkalımı anlamlı düzeyde azalttığı saptandı ($p: 0,047$).

Tablo 9: Yaş, cinsiyet ve klinikopatolojik verilerin genel sağkalımla ilişkisi

Özellikler	Genel sağkalım (ortalama ay) p değeri *		Özellikler	Genel sağkalım (ortalama ay) "p değeri" *	
Yaş			Ekstralenfatik tutulum		
- <50 yaş	(77)	0,518	- Var	(38)	0,067
- ≥50 yaş	(72)		- Yok	(81)	
Cinsiyet			Dalak Tutulumu		
- Kadın	(78)	0,174	- Var	(71)	0,426
- Erkek	(68)		- Yok	(77)	
B semptomları			Sedimentasyon		
- Var	(71)	0,432	- >50	(81)	0,073
- Yok	(77)		- ≤50	(45)	
Bulky kitle			Nodal alan sayısı		
- Var	**	0,375	- 1-3	(80)	0,541
- Yok			- 4-6	(35)	
			- ≥7	(63)	
Mediastinal kitle	.		Kemik iliği tutulumu		
- Var	**	0,523	- Var	**	0,277
- Yok			- Yok		
Evre			EORTC		
- Erken (I-II)	(83)	0,090	- İyi risk	**	0,076
- İleri (III-IV)	(63)		- Kötü risk		
Subtip			IPS		
- NS	(79)	0,235	- 0-3	(79)	0,013
- MS+NOS	(69)		- ≥4	(17)	

(*log rank, **istatistik yapılamadı)

Hastalıkta tutulu nodal alan sayısının 3'ün altında olmasıyla progresyonsuz sağkalımın anlamlı olarak uzadığı görüldü (p=0,043). Ayrıca ekstralenfatik tutulumun bulunması ve sedimentasyonun 50 üzerinde olmasının progresyonsuz sağkalımı azalttığına yönelik sınırdan anlamlılık izlendi (sırasıyla p=0,051 ve p=0,090, Tablo10).

Tablo 10: Yaş, cinsiyet ve klinikopatolojik verilerin progresyonsuz sağkalımla ilişkisi

Özellikler	Progresyonsuz sağkalım (ortalama ay) p değeri *		Özellikler	Progresyonsuz sağkalım (ortalama ay) p değeri *	
Yaş			Ekstralenfatik tutulum		
- <50 yaş	(49)	0,707	- Var	(25)	0,051
- ≥50 yaş	(53)		- Yok	(59)	
Cinsiyet			Dalak Tutulumu		
- Kadın	(42)	0,308	- Var	(53)	0,898
- Erkek	(56)		- Yok	(49)	
B semptomları			Sedimentasyon		
- Var	(46)	0,756	- >50	(29)	0,090
- Yok	(53)		- ≤50	(58)	
Bulky kitle			Nodal alan sayısı		
- Var	(25)	0,998	- 1-3	(64)	0,043
- Yok	(51)		- 4-6	(15)	
			- ≥7	(37)	
Mediastinal kitle			Kemik iliği tutulumu		
- Var	(28)	0,525	- Var	(30)	0,554
- Yok	(49)		- Yok	(53)	
Evre			EORTC		
- Erken (I-II)	(62)	0,104	- İyi risk	(58)	0,463
- İleri (III-IV)	(37)		- Kötü risk	(44)	
Subtip			IPS		
- NS	(49)	0,776	- 0-3	(51)	0,746
- MS+NOS	(49)		- ≥4	(16)	

(*log rank)

CD68, CD163 Ekspresyonu ile EBV ve Klinikopatolojik Parametrelerin İlişkisi:

CD68 PG-M1, CD68 KP1 ve CD163 belirteçlerinde izlenen makrofaj yoğunluğu belirlenen kesme değerlerine göre yukarıda bahsedilen tüm klinikopatolojik veriler ve EBV ile ilişkileri açısından istatistiksel olarak araştırıldı. EBER pozitifliğinin mikst sellüler subtipde nodüler sklerozan subtipde göre daha sık olduğu gözlemlendi.

CD68 PG-M1 klonu ile belirlenen makrofaj yoğunluğu %40'ın altında olanlarla olmayanlar arasında anlamlı farklılık saptanan klinikopatolojik veriler tablo 11'de gösterildi. B semptomu olanlarda, dalak tutulumunda, sedimentasyonun 50'nin üzerinde olması durumunda ve EORTC'ye göre kötü risk grubunda yer alanlarda, makrofaj yoğunluğunun daha fazla olduğu saptandı. Dokudaki HRS hücre yoğunluğunun az olduğu olgularda ise makrofaj yoğunluğunun azaldığı gözlemlendi. Ayrıca IPS 4 ve üzerinde olan olgulardaki makrofaj yoğunluğunun artmasına yönelik sınırdan anlamlılık gözlemlendi.

Tablo11: CD68 PG-M1 ekspresyon yoğunluğunun %40 kesme değerine göre klinikopatolojik veriler ve cinsiyetle karşılaştırılması

Özellikler	CD68 PG-M1 (Kesme değeri %40)		
	>%40 (n:18)	≤%40 (n:28)	p değeri
B semptomları			
- Var (n:23)	13 (%56,5)	10 (%43,5)	0,017
- Yok (n:23)	5 (%21,7)	18 (%78,3)	
Dalak tutulumu			
- Var (n:16)	10 (%62,5)	6 (%37,5)	0,020
- Yok (n:30)	8 (%26,7)	22 (%73,3)	
Sedimentasyon			
- >50 (n:17)	10 (%58,8)	7 (%41,2)	0,038
- ≤50 (n:29)	8 (%27,6)	21 (%72,4)	
EORTC			
- İyi risk (n:11)	1 (%9,1)	10 (%90,9)	0,019
- Kötü risk (n:35)	17 (%48,6)	18 (%51,4)	
IPS			
- 0-3 (n:39)	13 (%33,3)	26 (%66,7)	0,071
- ≥4 (n:7)	5 (%71,4)	2 (28,6)	
HRS			
- Az (n:8)	0 (%0)	8 (%100)	0,012
- Orta/bol (n:38)	18 (%47,4)	20 (%52,6)	

CD68 PG-M1 klonu ile belirlenen makrofaj yoğunluğu %10'ın altında olanlarla olmayanlar arasında anlamlı farklılık saptanan klinikopatolojik veriler tablo 12'de gösterildi. Erkek cinsiyette, B semptomu olanlarda, EORTC'ye göre kötü risk grubunda yer alanlarda ve EBV varlığında makrofaj yoğunluğunun arttığı saptandı.

Tablo12: CD68 PG-M1 ekspresyon yoğunluğunun %10 kesme değerine göre klinikopatolojik veriler ve cinsiyetle karşılaştırılması

Özellikler	CD68 PG-M1 (Kesme değeri %10)		
	>%10 (n:38)	≤%10 (n:8)	p değeri
Cinsiyet			
- Kadın (n:23)	16 (69,6)	7 (30,4)	0,023
- Erkek (n:23)	22 (%95,7)	1 (%4,3)	
B semptomu			
- Var (n:23)	22 (%95,7)	1 (%4,3)	0,023
- Yok (n:23)	16 (%69,6)	7 (%30,4)	
EORTC			
- İyi risk (n:11)	7 (%63,6,)	4 (%36,4)	0,079
- Kötü risk (n:35)	31 (%88,6)	4 (%11,4)	
EBER			
- Var (n:27)	27 (%100)	0 (%0)	<0,001
- Yok (n:19)	11 (%57,9)	8 (%42,1)	

CD68 PG-M1 klonunun her iki kesme değeriyle de, bahsedilen klinikopatolojik parametreler dışındaki veriler ve progresyon/nüks ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı.

CD68 KP1 klonu ile belirlenen makrofaj yoğunluğu %30 kesme değerinin altında olanlarla olmayanlar arasında anlamlı farklılık saptanan klinikopatolojik veriler Tablo 13'de gösterildi. B semptomu yokluğunda, dalak tutulumu olmadığında ve EBV yokluğunda makrofaj yoğunluğunun azaldığı gözlemlendi (p değerleri sırasıyla 0,008, 0,010 ve 0,044). Sedimentasyonun 50'nin altında olması durumunda, IPS'nin ≤ 3 olmasıyla, dokudaki HRS hücre yoğunluğunun az olduğu olgularda makrofaj yoğunluğunun azaldığına yönelik sınırdan anlamlılık saptandı.

Tablo13: CD68 KP1 ekspresyon yoğunluğunun %30 kesme değerine göre klinikopatolojik verilerle karşılaştırılması

Özellikler	CD68 KP1 (Kesme değeri %30)		P değeri
	>%30 (n:12)	\leq %30 (n:34)	
B semptomu			
- Var (n:23)	10 (%43,5)	13 (%56,5)	0,008
- Yok (n:23)	2 (%8,7)	21 (%91,3)	
Dalak tutulumu			
- Var (n:16)	8 (%50)	8 (%50)	0,010
- Yok (n:30)	4 (13,3)	26 (86,7)	
Sedimentasyon			
- >50 (n:17)	7 (%41,2)	10 (%58,8)	0,077
- \leq 50 (n:29)	5 (%17,2)	24 (%82,8)	
IPS			
- 0-3 (n:39)	8 (%25)	31 (%76,5)	0,064
- ≥ 4 (n:7)	4 (%57,1)	3 (42,9)	
HRS			
- Az (n:8)	0 (%0)	8 (%100)	0,070
- Orta/bol (n:38)	12 (%31,6)	26 (%68,4)	
EBER			
- Var (n:27)	10 (%37)	17 (%63)	0,044
- Yok (n:19)	2 (%10,5)	17 (%89,5)	

CD68 KP1 klonu ile belirlenen makrofaj yoğunluğu %10'ın altında olanlarla olmayanlar arasında anlamlı farklılık saptanan klinikopatolojik veriler tablo 14'de gösterildi. B semptomu olanlarda ($p<0,001$), dalak tutulumunda ($p=0,020$), EORTC'ye göre kötü risk grubunda yer alanlarda ($p=0,028$), IPS'nin 4 ve üzerinde olduğu olgularda ($p=0,038$) ve EBV varlığında ($p=0,007$) makrofaj yoğunluğunun arttığı saptandı. Ayrıca 50 yaş ve üzerinde olan olgularda, erkek cinsiyette ve dokudaki HRS hücre yoğunluğunun fazla olduğu olgularda makrofaj yoğunluğunun artmasına yönelik sınırdan anlamlılık gözlemlendi.

Tablo14: CD68 KP1 ekspresyon yoğunluğunun %30 kesme değerine göre yaş, cinsiyet ve klinikopatolojik verilerle karşılaştırılması

Özellikler	CD68 KP1 (Kesme değeri %10)		P değeri
	>%10 (n:30)	≤%10 (n:16)	
Yaş			
- <50 (n:30)	17 (%56,7)	13 (43,3)	0,088
- ≥50 (n:16)	13 (%81,3)	3 (%18,7)	
Cinsiyet			
- Kadın (n:23)	12 (52,2)	11 (47,8)	0,060
- Erkek (n:23)	18 (%78,3)	5 (21,7)	
B semptomu			
- Var (n:23)	21 (%91,3)	2 (%8,7)	<0,001
- Yok (n:23)	9 (%39,1)	7 (%30,4)	
Dalak tutulumu			
- Var (n:16)	14 (%87,5)	2 (%12,5)	0,020
- Yok (n:30)	16 (53,3)	14 (%46,7)	
EORTC			
- İyi risk (n:11)	7 (%63,6)	4 (%36,4)	0,028
- Kötü risk (n:35)	31 (%88,6)	4 (%11,4)	
IPS			
- 0-3 (n:39)	23 (%59)	16 (%41)	0,038
- ≥4 (n:7)	7 (%100)	0 (%0)	
HRS			
- Az (n:8)	3 (%37,5)	5 (%62,5)	0,083
- Orta/bol (n:38)	27 (%71,1)	11 (%28,9)	
EBER			
- Var (n:27)	22 (%81,5)	5 (%18,5)	0,007
- Yok (n:19)	8 (%42,1)	11 (%57,9)	

CD68 KP1 klonunun her iki kesme değeriyle de, bahsedilen klinikopatolojik parametreler dışındaki veriler ve progresyon/nüks ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı.

CD163 immunhistokimyasal boyası ile belirlenen makrofaj yoğunluğu %50 kesme değerinin altında olanlarla olmayanlar arasında anlamlı farklılık saptanan klinikopatolojik veriler Tablo 15'de gösterildi. B semptomu yokluğunda, dalak tutulumu olmadığında, sedimentasyonun 50'nin altında olması durumunda ve EORTC'ye göre iyi risk grubunda yer alan olgularda makrofaj yoğunluğunun azaldığı saptandı (p değerleri sırasıyla 0,001, 0,001, 0,017, 0,021). Ayrıca dokudaki HRS hücre yoğunluğunun az olduğu ve IPS'si 3 ve altında olan olgulardaki makrofaj yoğunluğunun azalmasında sınırdan anlamlılık gözlemlendi.

Tablo15: CD163 ekspresyon yoğunluğunun %50 kesme değerine göre klinikopatolojik verilerle karşılaştırılması

Özellikler	CD163 (Kesme değeri %50)		P değeri
	>%50 (n:12)	≤%50 (n:34)	
B semptomu			
- Var (n:23)	11 (%47,8)	12 (52,2)	0,001
- Yok (n:23)	1 (%4,3)	22 (91,3)	
Dalak tutulumu			
- Var (n:16)	9 (%56,3)	7 (%43,8)	0,001
- Yok (n:30)	3 (%10)	27 (%90)	
Sedimentasyon			
- >50 (n:17)	8 (%47,1)	9 (%52,9)	0,017
- ≤50 (n:29)	4 (13,8)	25 (%86,2)	
EORTC			
- İyi risk (n:11)	0 (%0)	11 (%100)	0,021
- Kötü risk (n:35)	12 (%34,3)	23 (%65,7)	
IPS			
- 0-3 (n:39)	8 (%20,5)	31 (%79,5)	0,064
- ≥4 (n:7)	4 (%57,1)	3 (%42,9)	
HRS			
- Az (n:8)	0 (%0)	8 (%100)	0,070
- Orta/bol (n:38)	12 (%31,6)	26 (%68,4)	

CD68 163 immunhistokimyasal boyası ile belirlenen makrofaj yoğunluğu %30 kesme değerinin altında olanlarla olmayanlar arasında anlamlı farklılık saptanan klinikopatolojik veriler tablo 16'da gösterildi. Diğer boyalara göre en fazla sayıda klinikopatolojik parametreyle ilişkisi gözlemlendi. 50 yaş ve üzerinde olan olgularda (p=0,008), B semptomu olanlarda (p=0,019), dalak tutulumunda (p=0,001), EORTC'ye göre kötü risk grubunda yer alanlarda (p=0,026), IPS'nin 4 ve üzerinde olduğu olgularda (p=0,037) ve EBV varlığında (p=0,015) makrofaj yoğunluğunun arttığı saptandı.

Tablo16: CD163 ekspresyon yoğunluğunun %30 kesme değerine göre yaş ve klinikopatolojik verilerle karşılaştırılması

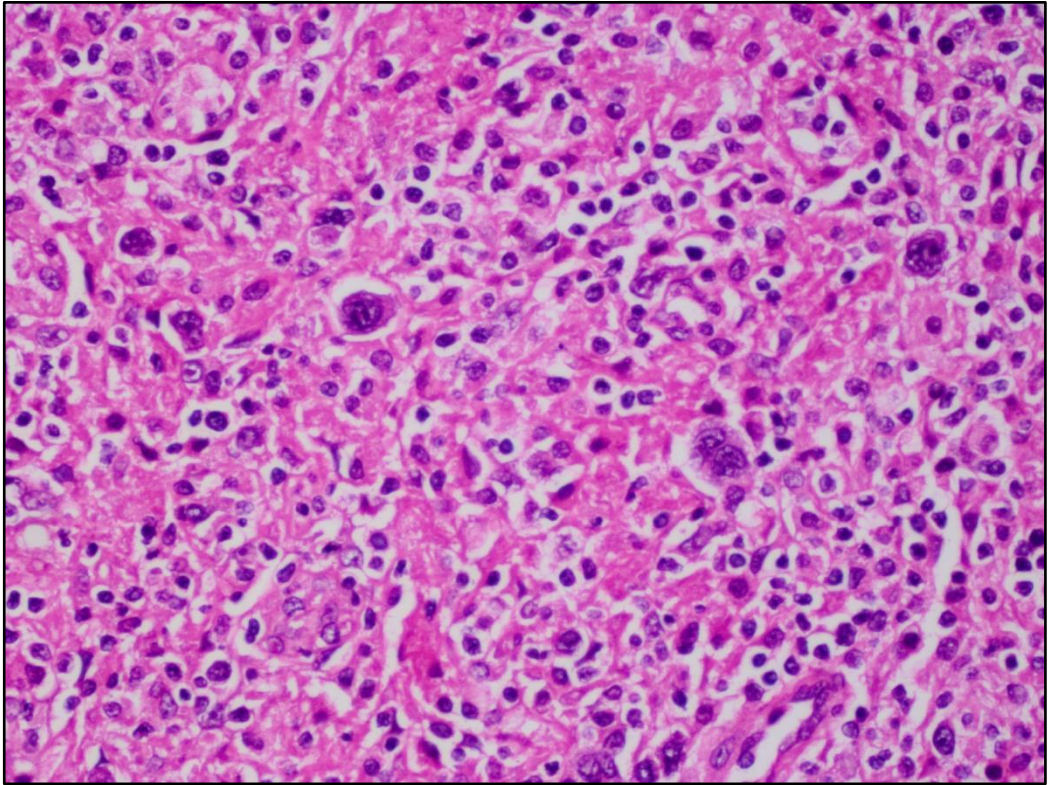
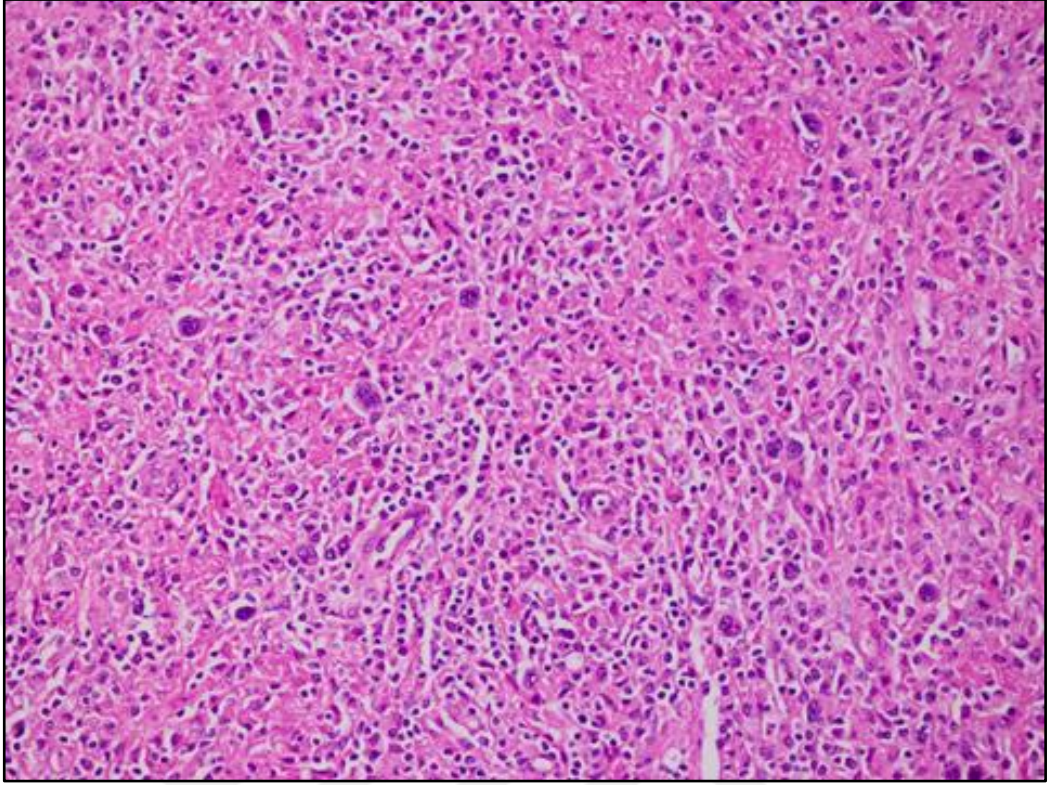
Özellikler	CD163 (Kesme değeri %30)		P değeri
	>%30 (n:22)	≤%30 (n:24)	
Yaş			
- <50 (n:30)	10 (%33,3)	20 (%66,7)	0,008
- ≥50 (n:16)	12 (%75)	4 (%25)	
B semptomu			
- Var (n:23)	15 (%62,5)	8 (%34,8)	0,019
- Yok (n:23)	7 (%30,4)	16 (%69,6)	
Dalak tutulumu			
- Var (n:16)	13 (%81,3)	3 (%18,8)	0,001
- Yok (n:30)	9 (%30)	21 (%70)	
EORTC			
- İyi risk (n:11)	2 (%18,2)	9 (%81,8)	0,026
- Kötü risk (n:35)	20 (%57,1)	15 (%42,9)	
IPS			
- 0-3 (n:39)	16 (%41)	23 (%59)	0,037
- ≥4 (n:7)	6 (%85,7)	1 (%14,3)	
EBER			
- Var (n:27)	17 (%63)	10 (%37)	0,015
- Yok (n:19)	5 (%26,3)	14 (%73,7)	

CD163 immunhistokimyasal boyasının her iki kesme değeriyle de, bahsedilen klinikopatolojik parametreler dışındaki veriler ve progresyon/nüks ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı.

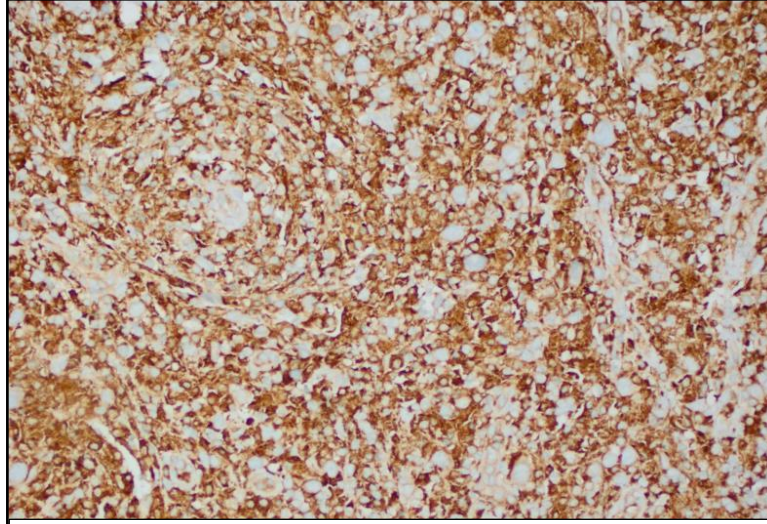
Tek değişkenli analizde anlamlı ve sınırda anlamlı ($0,05 \leq p < 0,010$) çıkan değişkenlerin çok değişkenli analizlerinde, tümör ilişkili makrofaj yoğunluğunun artmasının CD68 PG-M1 ve CD68 KP1'in %10 kesme değerlerinin ve CD163'ün %50 kesme değeri ve B semptomlarının varlığıyla (sırasıyla $p=0,028$, $p=0,002$ ve $p=0,019$), CD68 PG-M1'in %40 kesme değerinin ve CD163'ün her iki kesme değerinin dalak tutulumuyla (sırasıyla $p=0,049$, $p=0,013$ ve $p=0,002$), CD68 PG-M1 ve CD68 KP1'in %10 kesme değerlerinin ve CD163'ün %30 kesme değerinin EBV enfeksiyonu ile istatistiksel anlamlı ilişki içinde olduğu gösterilirken ($p=0,007$, $p=0,009$ ve $p=0,036$), CD68 KP1 %30 kesme değerinin B semptomlarının olması ve dalak tutulumu ile sınırda ilişkili olduğu gözlemlendi (Tablo 17).

Tablo17: Tek değişkenli analizlerde anlamlı ve sınırda anlamlı ($0,05 \leq p < 0,010$) bulunan değişkenlerin bağımsız değişkenler olarak bağımlı değişkenlerle karşılaştırılması

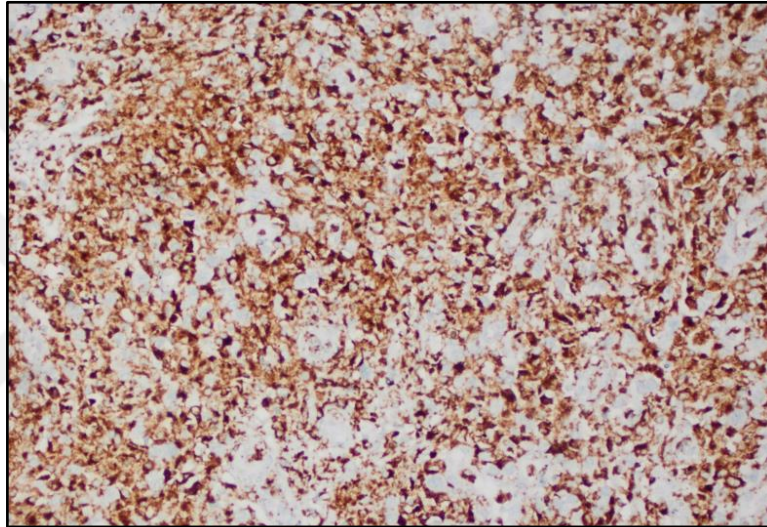
Bağımlı Değişkenler	Bağımsız Değişkenler					
	B semptomları	Dalak tutulumu	IPS	HRS	EORTC	EBER
CD68 PG-M1 Kesme değeri %40	-	+ ($p=0,049$)	-	-	-	-
CD68 PGM1 Kesme değeri %10	+ ($p=0,028$)	-	-	-	-	+ ($p=0,007$)
CD68 KP1 Kesme değeri %30	~ + ($p=0,064$)	~ + ($p=0,091$)	-	-	-	-
CD68 KP1 Kesme değeri %10	+ ($p=0,002$)	-	-	-	-	+ ($p=0,009$)
CD163 Kesme değeri %50	+ ($p=0,019$)	+ ($p=0,013$)	-	-	-	-
CD163 Kesme değeri %30	-	+ ($p=0,002$)	-	-	-	+ ($p=0,036$)



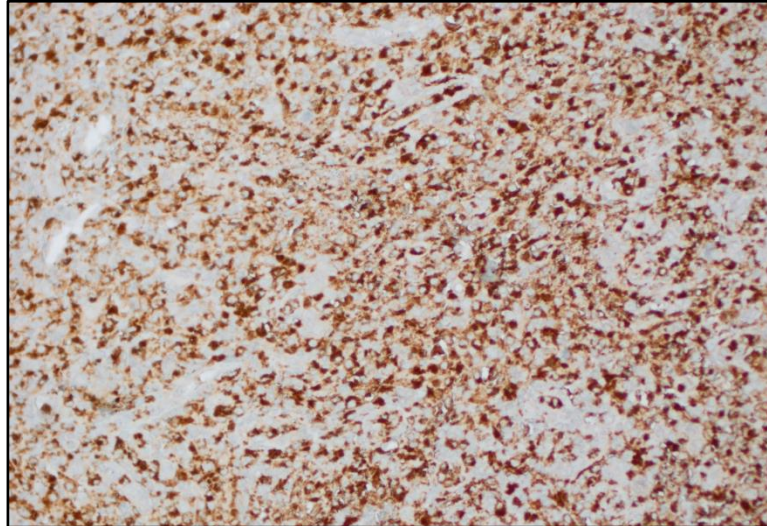
Resim 1. Olgu 29'daki orta/bol miktarda HRS hücreleri
(H-E, sırasıyla x200; x400)



CD163 boyanması %75

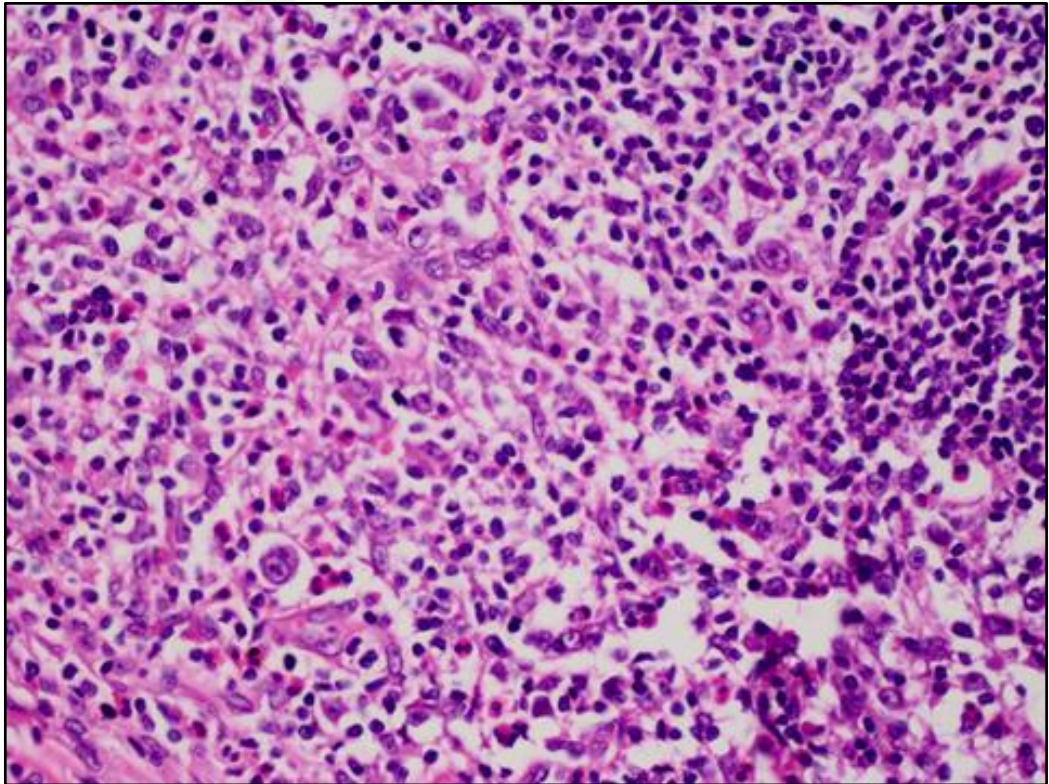
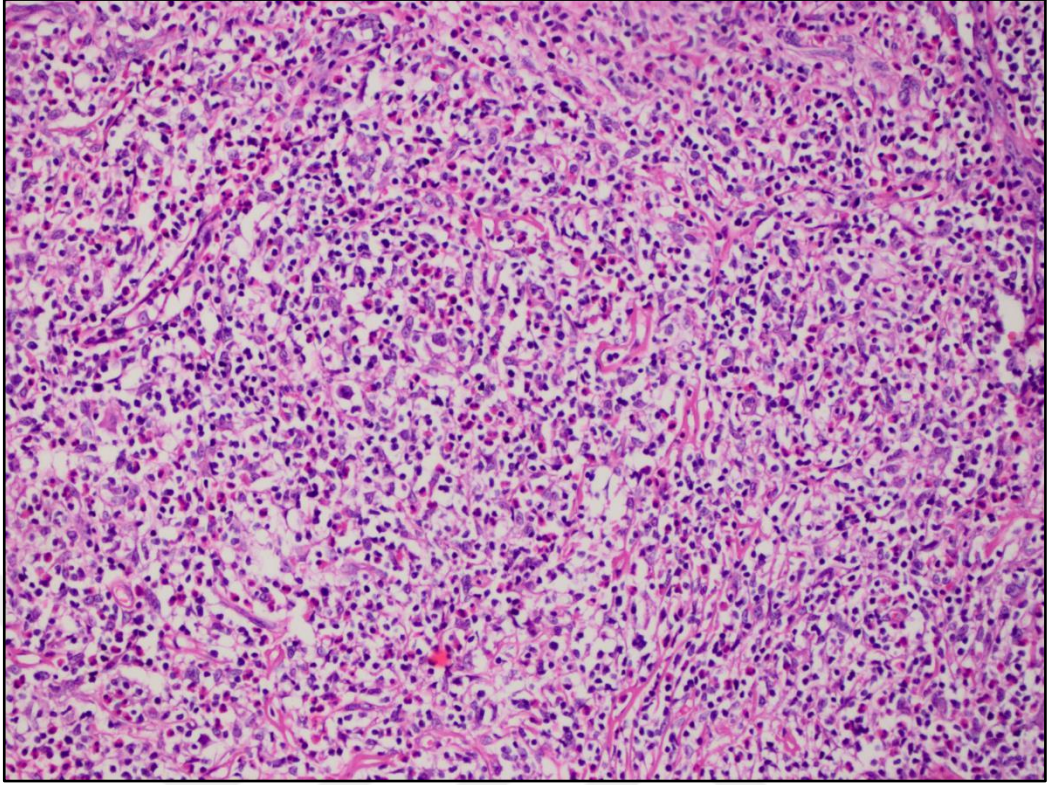


CD68 PG-M1 bovanması %60

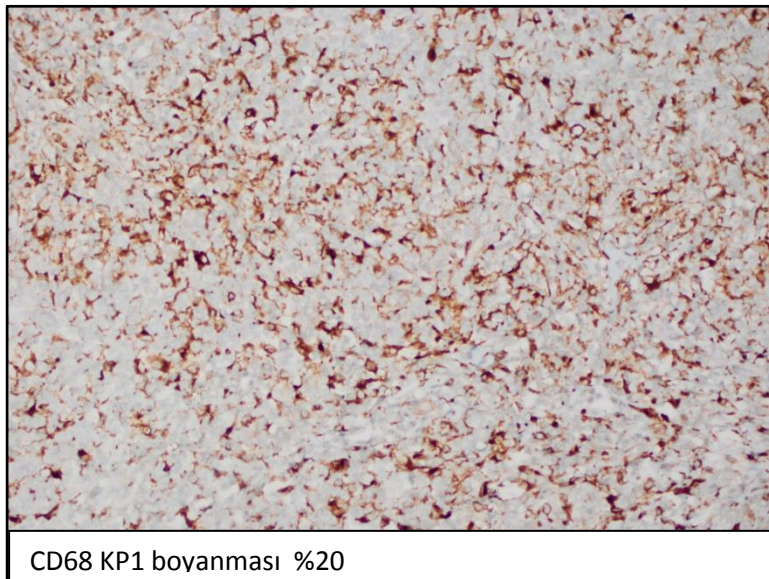
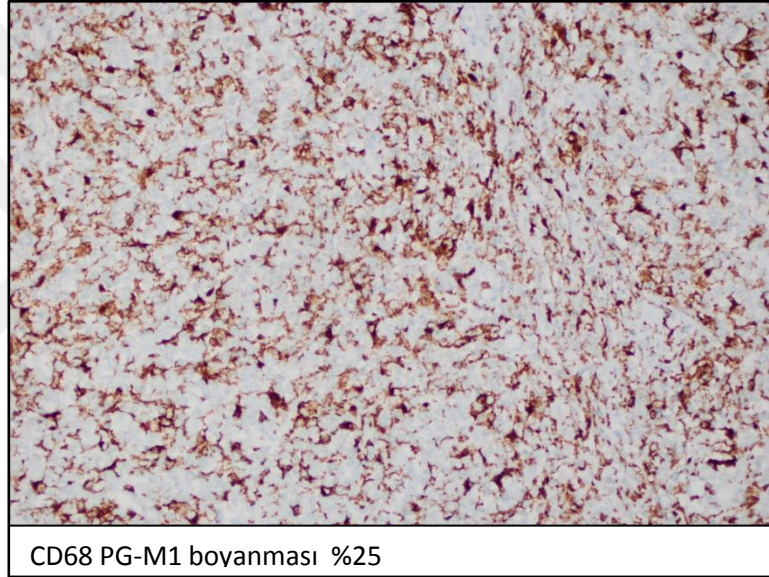
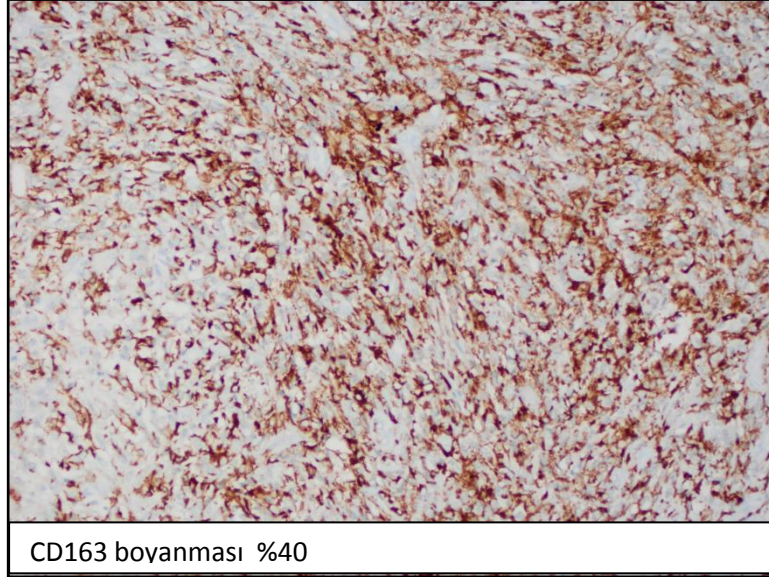


CD68 KP1 bovanması %50

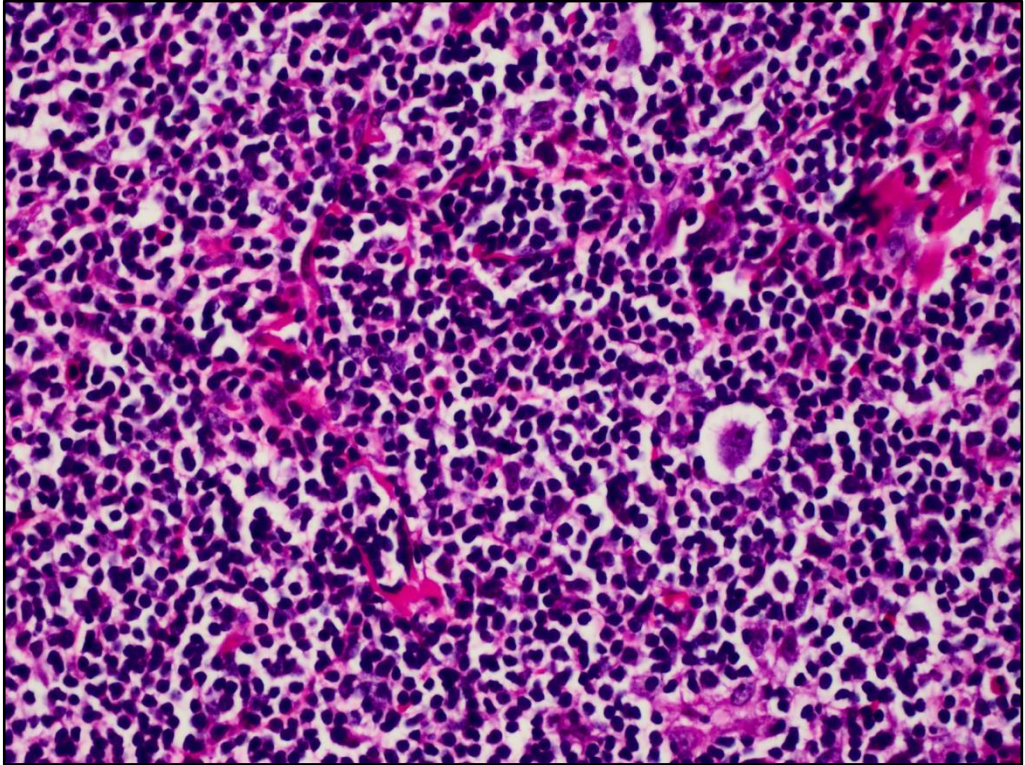
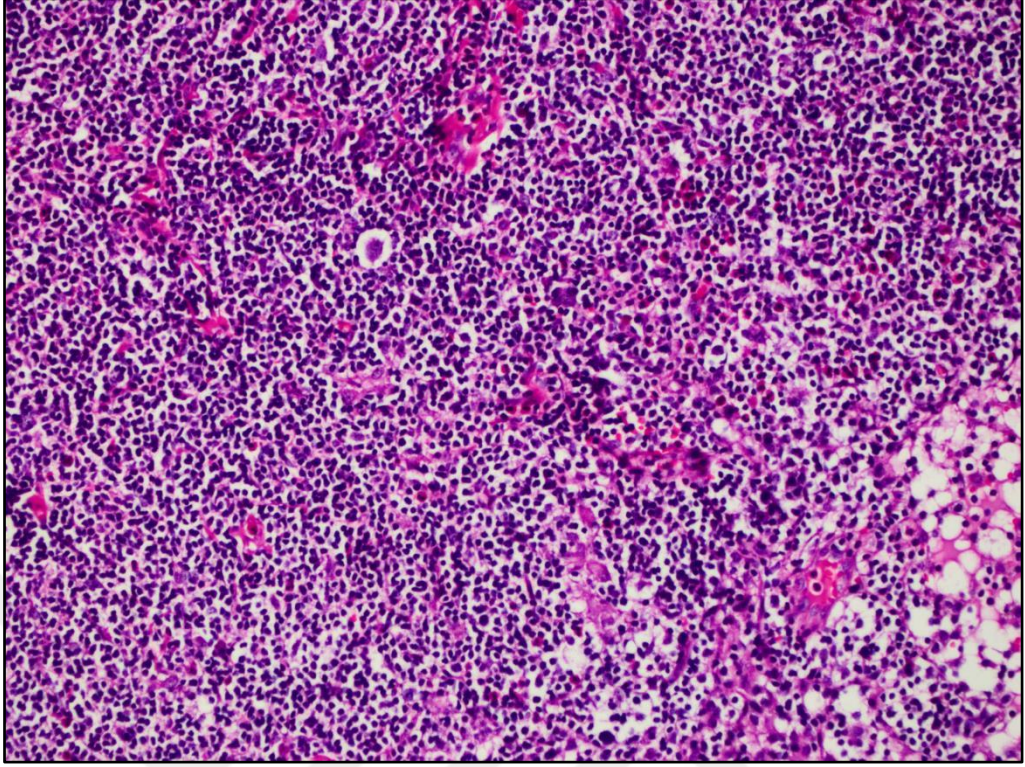
Resim 2. Olgu 29'daki sırasıyla CD163, CD68 PG-M1 ve CD68 KP1 ekspresyonu (DAB x200)



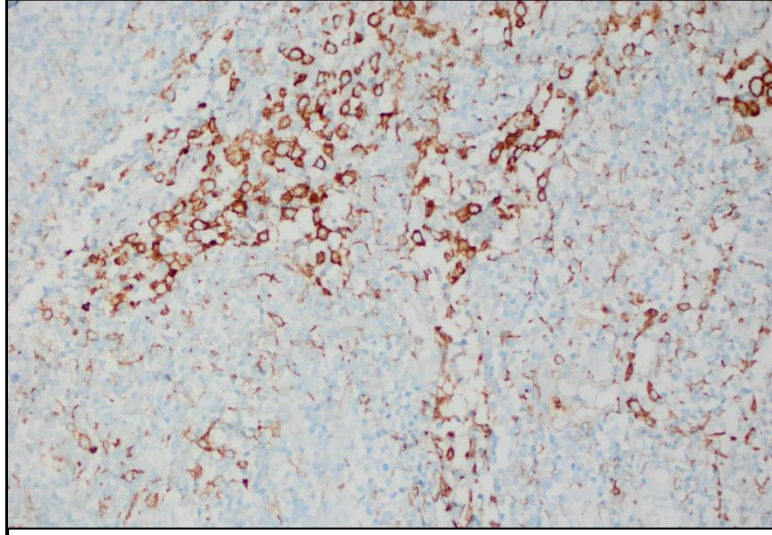
Resim 3. Olgu 23'deki orta miktarda HRS hücreleri
(H-E, sırasıyla x200; x400)



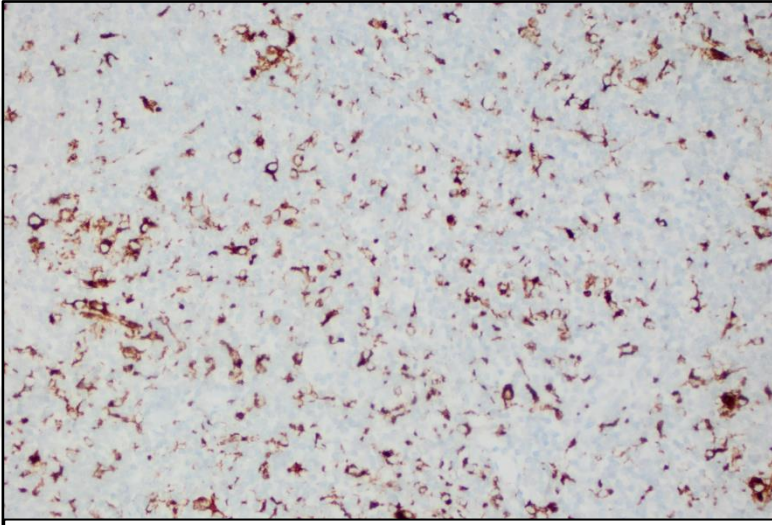
Resim 4. Olgu 23'deki sırasıyla CD163, CD68 PG-M1 ve CD68 KP1 ekspresyonu (DAB x200)



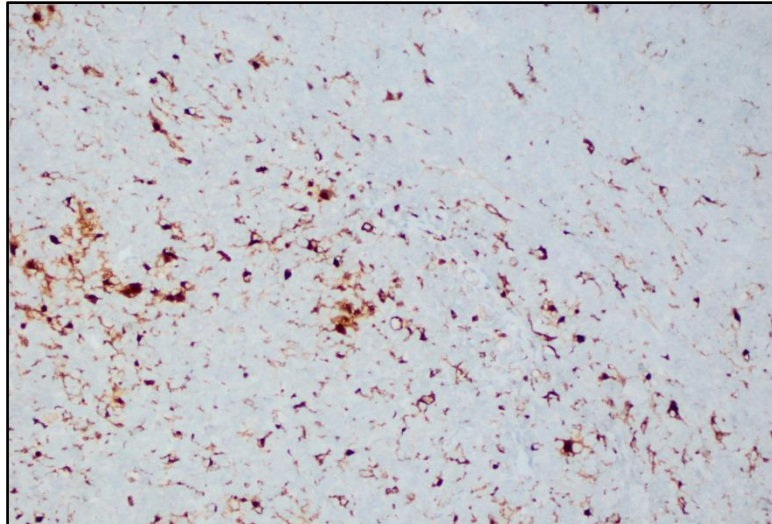
Resim 5. Olgu 32'deki az miktarda HRS hücreleri
(H-E, sırasıyla x200; x400)



CD163 boyanması %5-10

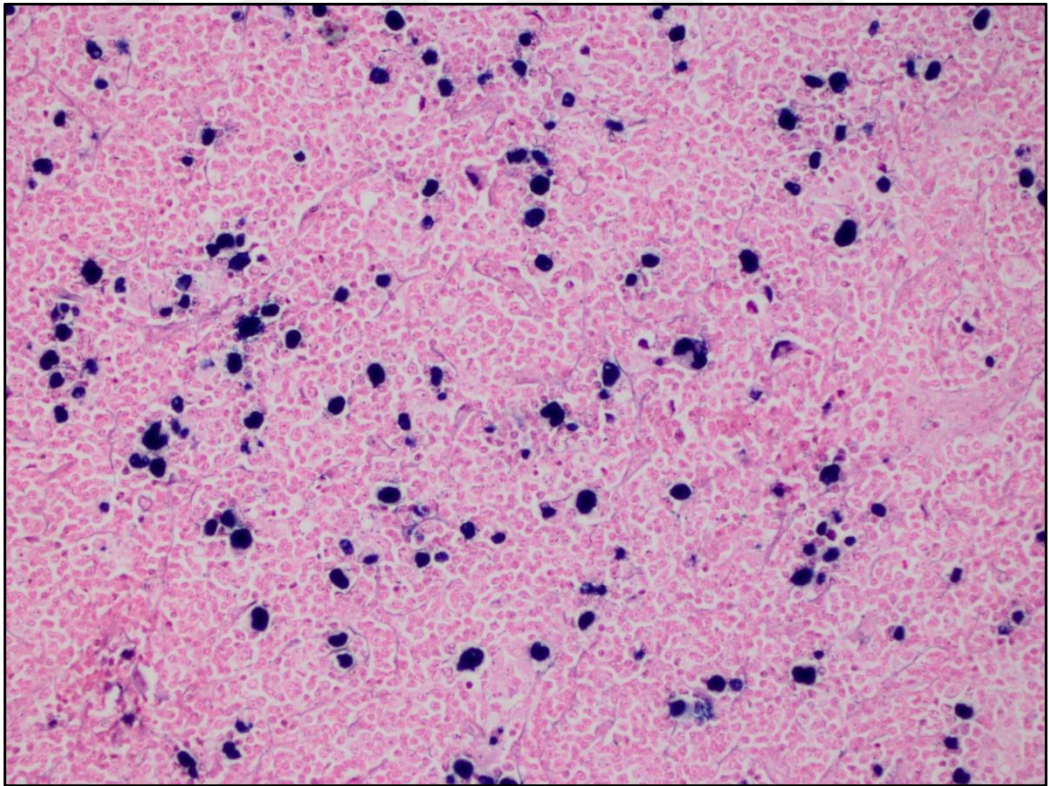
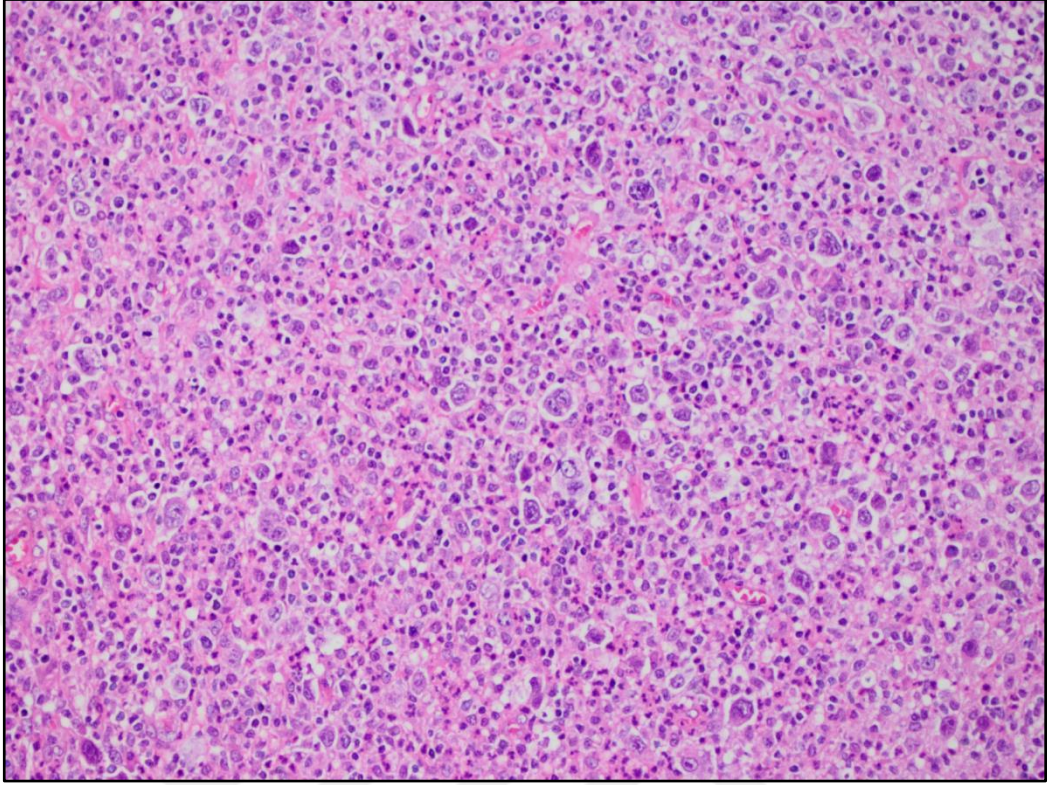


CD68 PG-M1 boyanması %5

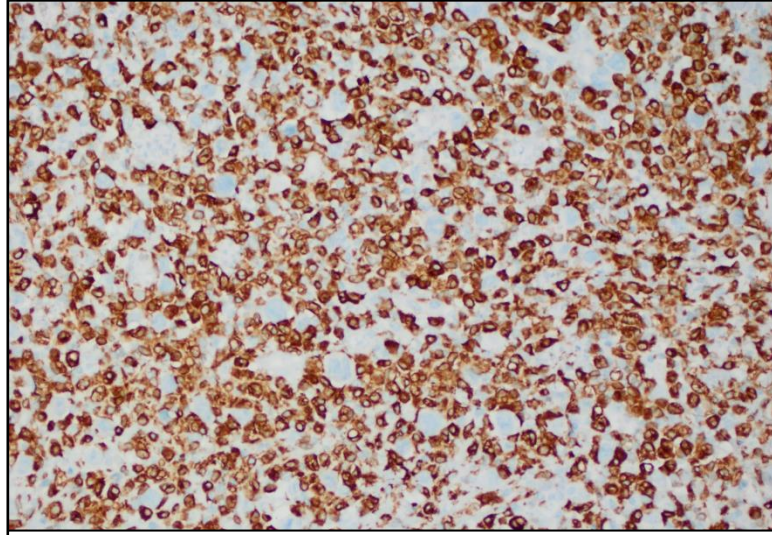


CD68 KP1 boyanması %5

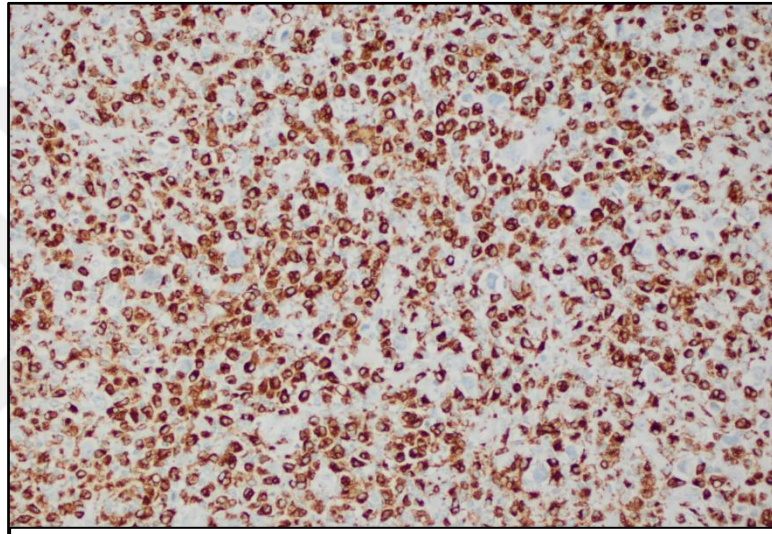
Resim 6. Olgu 32'deki sırasıyla CD163, CD68 PG-M1 ve CD68 KP1 ekspresyonu (DAB x200)



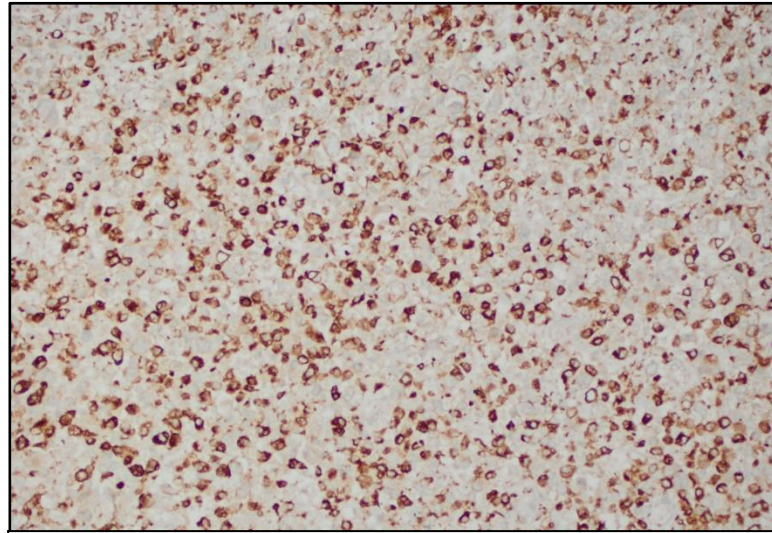
Resim 7. Olgu 42'deki bol miktarda HRS hücreleri ve HRS hücrelerindeki EBER pozitifliği (H-E x200 ve AP red x200)



CD163 boyanması %70

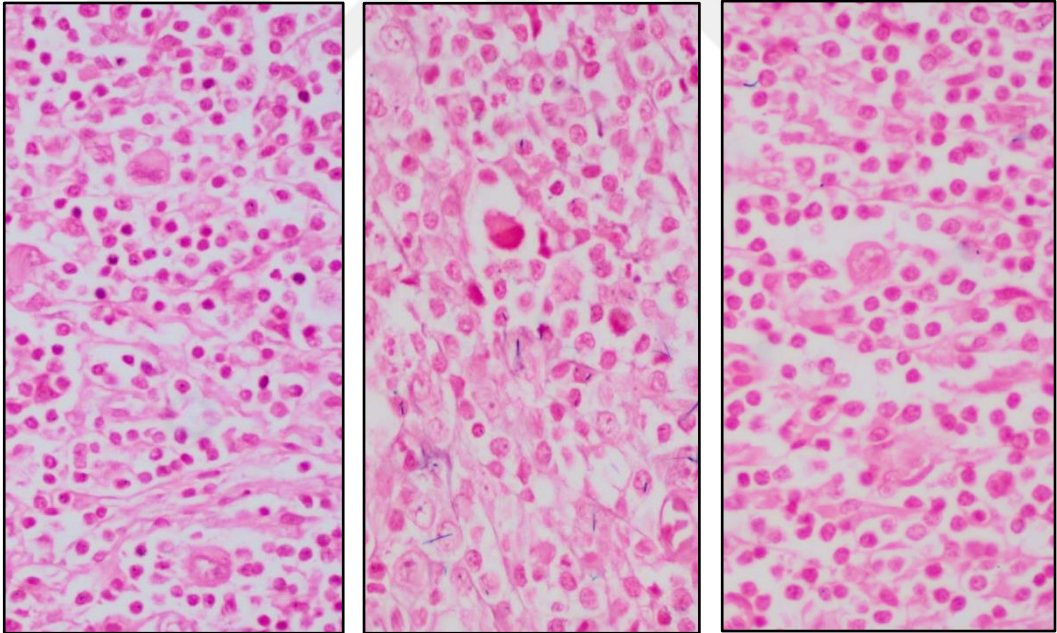
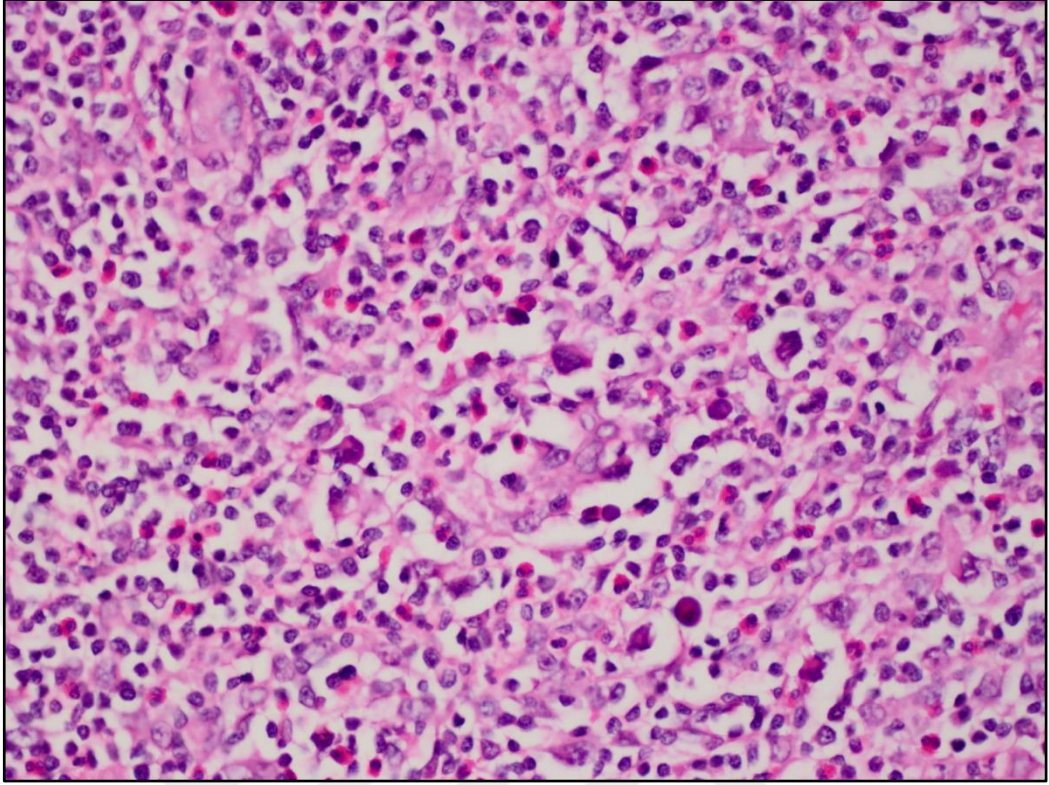


CD68 PG-M1 boyanması %65

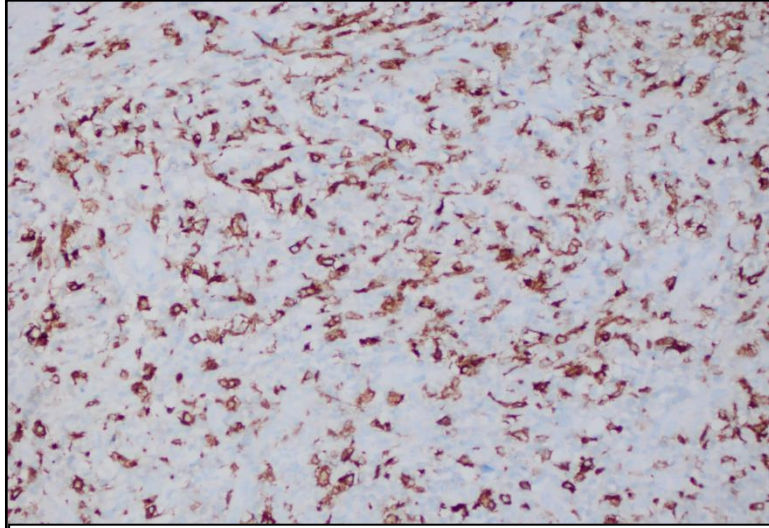


CD68 KP1 boyanması %45

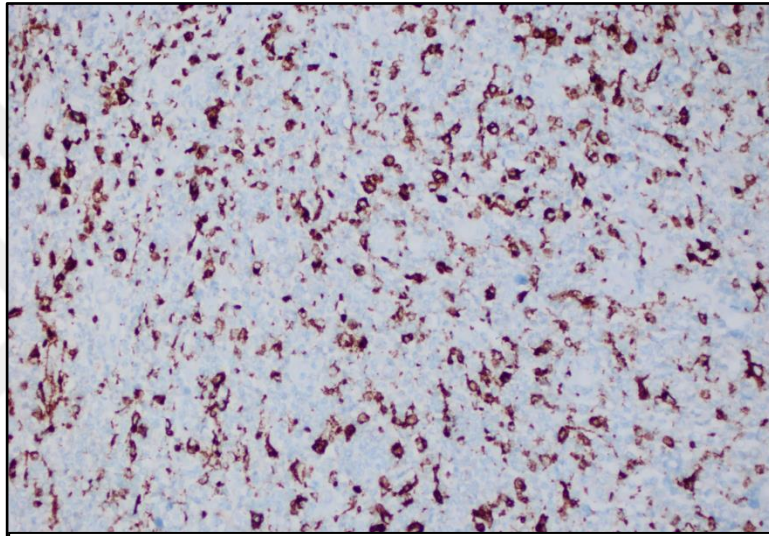
Resim 8. Olgu 42'deki sırasıyla CD163, CD68 PG-M1 ve CD68 KP1 ekspresyonu (DAB x200)



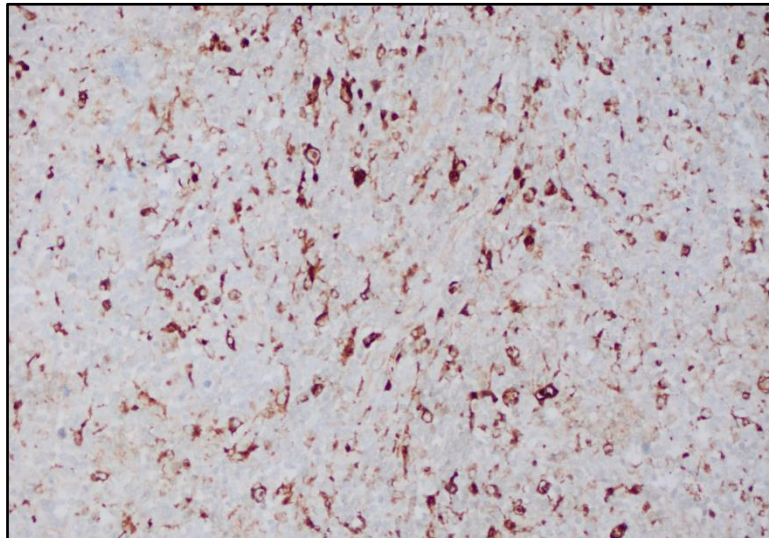
Resim 9. Olgu 18'deki az/orta miktarda HRS hücreleri ve HRS hücrelerindeki EBER negatifliği (H-E x400; AP red x400)



CD163 boyanması %10



CD68 PG-M1 boyanması %10



CD68 KP1 boyanması %5-10

Resim 10. Olgu 18'deki sırasıyla CD163, CD68 PG-M1 ve CD68 KP1 ekspresyonu (DAB x200)

TARTIŞMA

Makrofajlar, solid tümörlerde ve hematolojik malignitelerde tümör dokusunda genellikle bulunmaktadır (147). Makrofajlar, farklı fonksiyonel aktiviteleri bulunan çok yönlü hücreler olduğundan fonksiyonlarının daha kolay anlaşılması için yapay olarak zıt immünolojik fonksiyonları olan iki alt grup oluşturulmuştur. Proinflamatuvar aktivite gösteren M1 makrofaj, bakteriyal ürünler ve interferon- γ ile aktive olup yardımcı T lenfosit-1 (TH1) immun yanıtının gelişmesinde ve mikroorganizmalar ile tümör hücrelerinin yok edilmesinde rol oynar. Buna karşılık M2 makrofajlar immünsüpresif etki gösterirler, angiogenezisi ve tümör gelişimini desteklerler (148). İnsanlarda tümör-ilişkili makrofajların (TAM) up-regule genlerinin ekspresyonlarının in vitro olarak M1 ve M2 makrofajlarla karşılaştırılması sonucunda TAM profilinin M2 makrofajlara daha yakın olduğu gözlenmiştir (149). Makrofajların antitümör immunitiyi baskılayarak, tümör hücre migrasyonunu ve angiogenezisi stimüle ederek tümör progresyonunu desteklemesi ve kanser gelişimini kolaylaştırmasına yönelik deneysel kanıtlar artmaktadır (132,133,150). Makrofaj ilişkili genlerin tanımlandığı over ve meme kanseri, yumuşak doku sarkomu, folliküler lenfoma ve klasik Hodgkin lenfoma gibi malignitelerde CD68 pozitif TAM yoğunluğunun artmasının progresyonsuz sağkalımı azalttığı gösterilmiştir (134,136,151).

Çalışmamızda düzenli izlenmiş 46 KHL olgusu değerlendirilmiş olup bazı hastaların tanı aldıkları doku örneklerinde yeterli doku bulunmaması, bazı hastaların klinik takiplerine ve verilerine ulaşamaması, 2010 yılından önceki hasta takiplerinin sistemde düzenli bir şekilde bulunmaması nedeniyle istenilen hasta sayısına ulaşamamıştır. Benzer çalışmaların çoğunda değerlendirilen hasta sayısı daha çok olmakla birlikte bizim çalışmamıza yakın olgu sayısı ile yapılan çalışmalar da bulunmaktadır. Steidl ve arkadaşları 166, Kamper ve arkadaşları 288 KHL tanılı hastayı

değerlendirirken Harris ve arkadaşları 44, Jakovic ve arkadaşları 52 KHL hastasını çalışmalarına dahil etmişlerdir (135,136,141,152).

Makrofaj popülasyonunu kapsamlı bir şekilde değerlendirmek için pan-makrofaj belirteci olan CD68'in PG-M1 ve KP1 klonları ile daha dar sınırlı ve M2 makrofaj için daha spesifik bir makrofaj belirteci olduğu belirtilen CD163 kullanılmıştır. Dokulardaki boyanma oranının CD163 belirtecinde CD68 belirtecinin her iki klonuna göre daha fazla olduğu görülmüştür. Bu bulgu daha önce malign melanom ve leiomyosarkom gibi farklı malignitelere yapılan çalışmalar ile Kamper ve arkadaşlarının yaptığı KHL olgularında makrofaj yoğunluğunu CD163 ve CD68 (KP1 klon) immunhistokimyasal boyalarıyla değerlendirdiği çalışma ile Yoon ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile benzer niteliktedir (135,153,154). Zaki ve arkadaşlarının yaptıkları tekli yanı sıra ikili immunhistokimyasal yöntemle HLA-DR/CD68 (PG-M1) ile M1 makrofaj, CD163/CD68 ile M2 makrofajları belirlemeye yönelik çalışmalarında tekli analizde en fazla HLA-DR ile boyanma olduğu, CD163'ün CD68 PG-M1'den daha yoğun boyandığı, ikili analizde ise M2 makrofaj yoğunluğunun da M1 makrofajdan daha fazla olduğu saptanmıştır (143). Ancak CD68 (KP1) belirtecine göre CD163 ile boyanmanın daha az olduğunu gösteren karşıt çalışmalar da bulunmaktadır. Bu durumun yardımcı T lenfosit immun yanıtının CD163'ü down-regüle etmesi, sonucunda oluştuğu düşünülse de bunu destekleyecek bulgunun bulunmadığı belirtilmektedir (152). Çalışmamızda her üç belirteçle de Kamper ve arkadaşları gibi (135) mikst sellüler subtipde nodüler sklerozan subtipi göre daha fazla boyanmanın olduğu gözlemlenirken, Kayal ve arkadaşları CD68 ile nodüler sklerozan subtipteki boyanma yoğunluğunu daha yüksek bulmuşlardır (155).

TAM belirteçlerinin immunhistokimyasal ekspresyonları ile sağkalım ve klinik parametrelerin ilişkisini belirlemede, üzerinde anlaşılmış bir kesme değeri bulunmamakta olup çeşitli oranlar kullanılmıştır. Makrofaj yoğunluğunu %5'in altı, %5-25 ve %25'in üstü olarak değerlendiren üçlü skorlama (136,152), %5'in altı, %5-25, %25-50 ve %50'nin üstü olarak değerlendiren dörtlü skorlama (144-155) yanı sıra %20 (154) %25 (141), %30 (142,146) gibi tek kesme değeriyle yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmada,

daha önce kesme noktasını saptamada olgulardaki ekspresyon oranlarının medyan değerlerini esas alan çalışmaların yöntemi tercih edilerek (142) birincil kesme değerleri saptanmış, daha az ekspresyonun anlamlı olup olmadığını araştırmak için de ikincil ve daha küçük bir kesme değeri belirlenmiştir.

KHL'de tümör ile ilişkin makrofajların B semptomları ve kötü prognozla ilişkili rollerinden yıllar önce bahsedilmiş (126), daha sonra bu bulgular gen ekspresyon profili çalışmaları ile de desteklenmiştir. Steidl ve arkadaşlarının yaptıkları ilk gen ekspresyon profili çalışmasında, CD68 kullanılarak yapılan immunohistokimyasal analizin sonucunda TAM oranının %5'in üzerinde saptanmasının progresyonsuz sağkalımı azalttığını belirtmişlerdir. Aynı zamanda TAM oranının %5'in üzerinde olmasının otolog kemik iliği transplantasyonunun başarısızlığı ve sonrasında hastalık nüksü ile ilişkili olduğunu saptamışlar, buna ek olarak ileri evre hastalıkta da progresyonsuz sağkalımın azaldığını göstermişlerdir (136). Casulo ve arkadaşları da 155 KHL olgusunda TAM ile sağkalım ilişkisini değerlendirdikleri çalışmalarında CD68 (KP1) ile gösterilen makrofaj yoğunluğunun artması ile genel sağkalımın azaldığını, ancak hastalısız sağkalım ile anlamlı bir ilişki görülmediğini saptamışlardır (146). Sanchez ve arkadaşlarının ileri evre KHL tanılı, İspanya ve Houston'dan alınan hasta gruplarında yaptıkları çalışmada İspanya'dan katılan olgularda yüksek CD68 (PG-M1 ve KP1 klonu) düzeyleri ile hastalığa spesifik sağkalım süresinin kısalığı arasında anlamlı bir ilişki gösterilmiştir. Ancak Houston'dan alınan hasta grubunda ve CD163 ile de herhangi bir anlamlı ilişki saptanmamıştır (145). Bu durum çalışmalarda farklı sonuçların elde edilmesinde sosyo-demografik faktörlerin de etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada ise yalnızca CD68 PG-M1 ile %40 kesme değerinde TAM artışının genel sağkalım süresini azalttığı gözlemlenmiştir. Zaki ve arkadaşları ise hem tekli (CD163) hem de ikili (CD163/CD68 PG-M1) immunhistokimyasal analizlerinde CD163'le gösterilen M2 makrofaj yoğunluğunun artmasıyla genel sağkalımın kısaldığını CD68 PG-M1 ile ise sınırdan anlamlılık bulunduğunu belirtmişlerdir (143). Kamper ve arkadaşlarının 288 KHL olgusunu değerlendirdikleri çalışmada hem

CD163 hem de CD68 (KP1 klonu) yüksek ekspresyonu ile genel sağkalımın ve progresyonsuz sağkalım süresinin kısalığı arasında anlamlı bir ilişki izlenmiştir . Buna ek olarak hasta yaşının 45 ve üzerinde olmasının, erkek cinsiyetin, B semptomlarının olmasının ve IPS'nin 2'nin üzerinde olmasının genel ve progresyonsuz sağkalım süresini azalttığını belirtmişlerdir (135). Benzer şekilde Yoon ve arkadaşlarının çalışmasında da progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalım süresinin kısalığı ile ilişkili bulunduğu belirtilen faktörler CD68 KP1 klonu ve CD163 ile boyanan makrofaj yoğunluğunun artması, yaşın 45'in üzerinde olması, 4 ve üzerinde IPS skoru ve B semptomlarının varlığıdır (154). Bunlara ek olarak Panico ve arkadaşlarının 121 olguluk serilerinde erkek cinsiyet, yaşın 45'in üzerinde olması, ileri evre, 2'nin üzerinde IPS skoru ve kötü EORTC skorunun genel sağkalımın süresinin kısalığıyla; kütleli ("bulky") hastalığın progresyonsuz sağkalım süresinin kısalığıyla; CD68 (KP1 klonu) ile boyanan yüksek oranda TAM varlığının ise her iki sürenin de kısalığıyla ilişkili olduğu saptanmıştır (142). Çalışmamızda genel sağkalım süresinin kısalığıyla yalnızca 4'ün üzerinde IPS skorunun anlamlı bir ilişki gösterdiği saptanmış olsa da, ileri evrenin ve kötü EORTC skorunun genel sağkalım süresini; ekstralenfatik tutulum ve sedimentasyonun yüksek olmasının ise hem genel sağkalım hem de progresyonsuz sağkalım süresini kısalttığına ilişkin sınırdan anlamlılık bulunmuştur. TAM yoğunluğunu ve klinik parametrelerle sağkalım süreleri arasında diğer çalışmalara göre daha az ilişki saptanmış olması olgu sayısının oransal azlığına bağlanabileceği düşünülmüştür. Ancak olgu sayısının çalışmamızdakine yakın olduğu Jakovic ve arkadaşlarının çalışmalarında CD68 (PG-M1 klonu) ile belirlenen TAM yoğunluğu artışı ile hem genel sağkalım hem de hastalıksız sağkalım sürelerinin anlamlı biçimde kıaldığı ortaya koymuşlardır (141). Ancak çalışmamızın tersine ele alınan 52 olgunun tümünün ileri evrede olması, farkı açıklayabilir. Yazarlar ayrıca, çalışmamıza benzer biçimde, 2 ve üzeri IPS skorunun yüksek sedimentasyon hızının ve "bulky" hastalık bulunmasının genel sağkalım süresini anlamlı biçimde azalttığını gözlemlemişlerdir (141). Harris ve arkadaşlarının 41 olguluk serisinde, çalışmamızdaki sonuçlara benzer

biçimde, CD68 (KP1 klonu) ve CD163 ile boyanan makrofaj yoğunluğu ile hastalık nüksü arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir (152). Tüm bunların tersine, daha az sayıda olmakla birlikte, her üç belirtecin de kullanıldığı ve TAM oranının artması ile genel sağkalımın ya da progresyonsuz sağkalımın veya her ikisinin birlikte süresinin uzadığını belirten çalışmalar da bulunmaktadır (156-163).

Makrofaj yoğunluğu ile sağkalım arasında tek değişkenli analizlerde anlamlı ilişki saptanan çalışmaların çoğunda, çok değişkenli analizde de makrofaj yoğunluğunun bağımsız bir kötü prognostik bir faktör olduğu gösterilmiştir. (141,143,154,160,162). Ancak Casulo ve arkadaşları çalışmalarında çok değişkenli analizde bu ilişkiyi saptamamışlardır (146).

Literatürdeki bu çalışmaların bazılarında, çalışmamızda olduğu gibi, TAM yoğunluğu ile sağkalım ilişkisi yanı sıra klinikopatolojik parametrelerle ilişkiler de değerlendirilmiştir (135,136,142,154). Kamper ve arkadaşları (135) CD68 (KP1)+ ve CD163+ TAM artışının ileri evre ve mikst sellüler subtip ile; CD163+ TAM artışının 2'nin üzerinde IPS skoru ile; Yoon ve arkadaşları (154) CD163+ TAM artışının 45 yaş ve üzerinde olmak, erkek cinsiyet, 4 ve üzerinde IPS skoru ve B semptomlarının varlığı ile; Panico ve arkadaşları (142) CD68 (KP1)+ TAM artışının erkek cinsiyet, ileri evre hastalık, 2 ve üzerinde IPS skoru ve LDH seviyesinin düşük olması ile anlamlı biçimde ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda, bu çalışmalara benzer biçimde, her üç belirteçle pozitif TAM artışının B semptomlarının varlığı, dalak tutulumu ve kötü EORTC skoru ile; CD68 PG-M1+ ve CD163+ TAM artışının sedimentasyonun yüksekliği ile; yalnızca CD68 PG-M1+ TAM artışının erkek cinsiyetle; yalnızca CD163+ TAM artışının ise ileri yaş ve yüksek IPS skorları ile anlamlı biçimde ilişkili olduğunu gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda ayrıca, Yoon ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi (154), hem tek hem de çok değişkenli analizlerde klinik parametrelerle en fazla sayıda anlamlı ilişkisi bulunan makrofaj belirtecinin CD163 olduğu saptanmıştır. En fazla sayıda klinik parametreyle ilişkisi izlenen kesme değerleri CD68 PG-M1 klonu için %40, CD68 KP1 klonu için %10 ve CD163

için %30 olarak belirlenmiş ve bu değerlerin literatürdeki değerlere benzer olduğu gözlemlenmiştir (142,146,154).

Gerek çalışmamızda ve gerekse belirtilen pek çok yayında anlamlı bulunan ilişkilerin anlamsız olduğunu bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Bunlardan biri Kayal ve arkadaşlarının 100 olguluk serisi olup, CD68+ TAM artışı ile progresyonsuz ve genel sağkalım süreleri, yaş, cinsiyet, hastalığın evresi, B semptomları, “bulky” kitle ve IPS gibi klinik parametreler arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir (155). Benzer biçimde Agur ve arkadaşları CD68 (PG-M1)+ TAM artışı ile progresyonsuz sağkalım arasında;(163); Azambuja ve arkadaşları da hem CD68 (KP1)+ hem de CD163+ TAM artışı ile, çalışmamızda da olduğu gibi genel ve hastalıksız sağkalım arasında, hatta bunlarla diğer her hangi bir klinik parametre arasında anlamlı bir ilişki saptamamışlardır (144).

Literatürdeki bu bilgilerin ışığında, genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım sürelerine TAM yoğunluğunun etkisi yönünden üç belirteç kıyaslandığında, Sanchez ve arkadaşları İspanyol hasta grubunda CD163'ün çalışmamızdaki gibi her iki klonunun değerlendirildiği CD68'e göre daha az efektif olduğunu (145), bunun tersine Zaki ve arkadaşları CD163'ün daha anlamlı CD68 PG-M1'in ise sınırda anlamlı olduğunu savlamışlardır (143). Kamper ve arkadaşları ile Yoon ve arkadaşları ise hem CD163 ve hem de CD68 (KP1) ile progresyonsuz sağkalım ile genel sağkalım arasında anlamlı ilişki gözlemlemişlerdir (135,154). Bunun da tersine, Azambuja ve arkadaşları ne CD163 ile ne de CD68 (KP1) ile sağkalım süreleri arasında herhangi bir ilişki saptamamışlardır (144). Bu çelişkili sonuçlar TAM'ların saptanan kötü prognostik rollerinin M2 makrofajlara sınırlı olmadığını ve bu nedenle de CD163 ve pan-makrofaj belirteci olan CD68'in birlikte kullanımının daha iyi olabileceğini düşündürmektedir. CD68'in hangi klonunun değerlendirmede daha anlamlı olacağı da tam olarak açık değildir. Literatürdeki farklı yayınlarda her iki klonla da sağkalım arasında anlamlı ilişki gözlenirse de çalışmalarda en çok CD68'in KP1 klonu kullanıldığından bu klonla anlamlı ilişkinin daha fazla olduğu görülmektedir (135,154,156-158). Çalışmamızda, CD68 PG-M1 klonunun genel sağkalım süresinin belirlenmesinde KP1

klonundan daha etkili olabileceği sonucu çıkarılmıştır. Ancak bizim gibi CD68'in her iki klonunu da çalışmalarında değerlendiren Sanchez ve arkadaşları, Houston'dan alınan hasta grubunda CD68'in her iki klonunda da hastalığa spesifik sağkalım süresi arasında anlamlı ilişki saptamışlardır (145).

Bahsedilen çalışmaların bazılarında ayrıca tümördeki TAM yoğunluğunun konağın immun yanıtını etkileyen EBV enfeksiyonuna bağlı olarak değiştiği söylenmektedir (135,142,145,154). EBV'nin kodladığı LMP1 daha önce belirtildiği üzere enfekte B hücrelerinde güçlü transformasyon yapıcı etki ve antiapoptotik potansiyele sahiptir (33,35). HRS hücrelerinde EBV prevalansı epidemiyolojik faktörler ve histolojik subtipine bağlı olarak değişmektedir. EBV, KHL hastalarının %40-60'ında neoplastik hücrelerde bulunmakta olup en sık mikst sellüler KHL olgularında (%75) görülmektedir (164). Biz de çalışmamızda mikst sellüler subtip KHL olgularında diğerlerine göre EBER pozitifliğinin daha sık olduğunu gördük.

EBV enfeksiyonunun KHL olgularında tümör dokusunun mikroçevresini değiştirdiği belirtilmektedir. EBV enfeksiyonunun HRS hücrelerinde çeşitli kemokinlerin özellikle de CCL20 ve aktive T hücreleri için kemoatraktan olan IP-10'nun salınımını arttırarak ortamda regülatör T lenfositlerinin toplanmasına ve bunun devamında da makrofajların birikimine katkıda bulunduğu bildirilmektedir (165). Chetaille ve arkadaşlarının çalışmasında EBV enfeksiyonlu KHL olgularının enfeksiyon olmayan olgulara göre daha iyi bir klinik gidişat sergilememeleri EBV enfeksiyonuna bağlı olan immun yanıtın tümör hücrelerinin yok edilmesinde yeterli olmadığını düşündürmektedir (129). Benzer olarak bahsettiğimiz çalışmaların bazılarında EBV enfeksiyonu ile genel ya da progresyonsuz sağkalım arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir (135,144). Biz de çalışmamızda EBER pozitifliği ile genel sağkalım arasında anlamlı bir ilişki gözlemedik ancak progresyonsuz sağkalımı uzattığı ile arasında sınırda anlamlılık saptadık. Fakat Yoon ve arkadaşları çalışmalarında EBER pozitifliğinin hastalığa özgü sağkalım ve genel sağkalım süresini, Azambuja ve arkadaşları da progresyonsuz sağkalım süresini kısalttığını bildirmişlerdir

(144,154). Bu bilgiler EBV enfeksiyonun KHL'da prognostik rolünün tartışmalı bir konu olduğunu da vurgulamaktadır.

Kemper ve arkadaşları, Sanchez ve arkadaşları ile Azambuja ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda HRS hücrelerinde EBV enfeksiyonun olmasıyla CD68 ve CD163 immunhistokimyasal boyalarıyla belirlenen TAM yoğunluğunun arttığını saptamışlardır (135,144,145). Bu çalışmada da her üç belirteçle EBER+ olgularda negatif olanlara göre TAM yoğunluğunun daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu durum, EBV varlığının immun yanıtta ve makrofajların kutuplaşmasında etkili bir faktör olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bunun tersine, iki parametre arasında anlamlı ilişki saptamayan çalışmalar da bulunmaktadır (144).

Sonuçta tüm bu çalışmalarda farklı sonuçların elde edilmesine, hasta gruplarında (etnik köken ve evre gibi) ve olgu sayısındaki değişiklikler, teknik yöntemlerin aynı olmaması, farklı makrofaj belirteçlerinin kullanılması, kesme değerlerindeki tutarsızlıklar ve patoloğların boyaları değerlendirmedeki farklılıkları neden olabilir.

Literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında çalışmamızdaki hasta sayısının oransal olarak az olduğu görülmektedir. Bu nedenle hastaları gruplara ayırarak değerlendirmek, hasta sayısını daha da azaltacağı için mümkün olmamıştır. Ayrıca KHL sağkalım süresi uzun olan bir hastalık olduğu için, düzenli takip süresi daha uzun olan olguların çoğunlukta olması yıllar içinde olayların (progresyon, nüks, ölüm) olma olasılığını arttıracığından daha anlamlı sonuçlar elde edilmesine katkıda bulunabilir. Çalışmamızda en uzun takip süresinin 89 ay, median değer ise 23,5 ay olmasının, bazı bulguların ortaya konmasına engel teşkil etmiş olabileceği düşünülmüştür. Daha çok hasta içeren ve daha uzun izlem süreleri bulunan çalışmaların daha değerli olacağı açıktır.

Bu çalışmadaki amaç, bahsedilen diğer çalışmalarda olduğu gibi, KHL'da şu anki tedavi rejimlerine ek ya da alternatif yeni tedavi yöntemlerinin keşfi ve kullanımına katkıda bulunmaktır. Bu yönde en çok araştırılan konulardan biri olan TAM patofizyolojisindeki anlaşılabilirliğin artmasıyla birlikte, bunun klinik bulgular ve sağkalım üzerine olası etkileri ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Tartışmaya hala açık olmakla birlikte bu tür etkilerin varlığı yönündeki kanıtlar giderek arttığından, TAM belirteçlerinin KHL'da rutin olarak uygulanması ve patoloji raporunda yardımcı bir prognostik faktör olarak belirtilmesinin doğru olacağı sonucuna varılmıştır.



SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Son dönemlerde KHL'de yeni biyolojik prognostik faktörler belirlemeye yönelik yapılan çalışmaların sayısı artmaktadır. Bu çalışmaların başlıca konularından birisi de KHL'de TAM yoğunluğunun sağkalım ve hastaların tedavisinin belirlemede rol oynayan ve prognostik risk sınıflamasında yer alan klinik ve laboratuvar parametreleri ile ilişkisinin araştırılmasıdır.

Bu çalışmada 46 KHL olgusu CD68 PG-M1, CD68 KP1 ve CD163 ekspresyonu ile TAM yoğunluğu açısından ve EBER ile EBV enfeksiyonu varlığı açısından değerlendirilmiştir.

Literatürde TAM yoğunluğunun artması ile genel sağkalım, progresyonsuz sağkalım ya da hastalısız sağkalım süresinin kısaldığına yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda genellikle CD163 ile CD68'in PG-M1 ya da KP1 klonu ya da sadece CD68'in iki klonundan biri kullanılmıştır. Hem CD163 hem CD68 ile ya da bu belirteçlerin herhangi biriyle sağkalım arasında anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Bunların yanı sıra bu üç belirteçle belirlenen TAM yoğunluğu ile sağkalım arasında anlamlı ilişki saptamayan çalışmalar da yer almaktadır. Çalışmamızda yalnızca %40 kesme değerinde CD68 PG-M1+ TAM artışının genel sağkalım süresini kısalttığı gözlemlenmiştir.

Literatürde yer alan pek çok çalışmada, TAM yoğunluk artışının sağkalım ile anlamlı ilişkisinin yanı sıra klinikopatolojik ve laboratuvar parametreleri ile de anlamlı ilişkiler saptanmıştır. Bu klinik parametreler çoğunlukla hastanın ileri yaşta olması (>45 yaş), erkek cinsiyet, B semptomlarının varlığı, yüksek IPS (>4 ya da >2) ve hastalığın ileri evre olmasıdır. Çalışmamızda her üç belirteç ile saptanan TAM artışının B semptomlarının varlığıyla, dalak tutulumuyla ve kötü EORTC skoru ile anlamlı ilişki gösterdiğini belirlenmiştir. Sağkalım sonuçlarında olduğu gibi bu konuda da tam tersi çalışmalar bulunmaktadır.

Çeşitli çalışmalarda TAM yoğunluğunun saptanmasında kullanılan ve belirleyici değeri açısından diğerlerinden üstün tek bir makrofaj belirteci olmadığı gibi özgün bir kesme değeri de ("cut-off" point) bulunmamaktadır.

Çalışmamızda CD163 pozitifliğinin CD68'in her iki klonuna göre daha fazla olduğu görülmüştür. Ancak tam tersi sonuçlar bildiren yayınlar da bulunmaktadır. Hem diğer çalışmalarda hem de bu çalışmada her üç belirtecin boyanma yoğunluğunda korelasyon bulunması TAM yoğunluğunu araştırırken herhangi bir belirtecin kullanılmasının yeterli olabileceğini düşündürse de, anlamlılık açısından çelişkili sonuçların bulunması, M2 makrofajlar için daha spesifik olduğu bildirilen CD163 ile pan makrofaj belirteci olan CD68'in birlikte kullanımının daha iyi olabileceğini göstermektedir.

CD68'in hangi klonunun kullanımının daha uygun olduğu konusu da açık değildir. Literatürdeki çalışmaların çoğunda KP1 klonu kullanıldığından sağkalımla anlamlı ilişkisi de daha fazla bulunmaktadır. Bu çalışmada olduğu gibi CD68'in iki klonunu da değerlendiren bir çalışmada, etnik kökenleri farklı iki hasta grubunun birinde her iki klonun da sağkalımla anlamlı ilişkisi gösterilirken, diğer hasta grubunda böyle bir ilişki ikisiyle de saptanmamıştır. Çalışmamızda yalnızca CD68 PG-M1klonu ile sağkalım arasında anlamlı ilişki gözlemlenmiştir. Bu durum TAM yoğunluğu ile sağkalım arasındaki ilişkide hastaların etnik kökenlerinin de rolünün olabileceğini düşündürmüştür.

EBV enfeksiyonunun KHL olgularında tümör dokusunun mikroçevresini değiştirdiği belirtilmektedir. Literatürde EBV enfeksiyonunun KHL'deki prognostik rolü tartışmalı olup sağkalımı etkilemediği ya da daha çok sağkalım süresini kısalttığı yönünde çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmamızda EBER pozitifliği ile genel sağkalım arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiş, ancak progresyonsuz sağkalım süresinin uzadığı yönünde sınırdan anlamlılık izlenmiştir.

Literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında bu çalışmanın oransal olarak daha küçük bir hasta grubunu kapsadığı ve daha geniş ve daha uzun izlem süreli serilerde daha çok çalışma gerektiği bir gerçek olmakla birlikte, KHL olgularında TAM yoğunluğunun belirlenmesinin patoloji laboratuvarlarında rutin olarak uygulanması ve raporlarda belirtilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

.



ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmada klasik Hodgkin lenfoma (KHL) olgularında CD68 ve CD163 ile tümör-ilişkin makrofaj (TAM) yoğunluğunu saptamak ve bunun neoplastik hücrelerdeki latent EBV enfeksiyonu, genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım süreleri ile olası ilişkilerini ortaya çıkarmak; ek olarak da bahsedilen değişkenlerin Uluslararası Prognostik skor (IPS), Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Organizasyonu (EORTC) skorlaması gibi prognostik belirteçler ve klinikopatolojik parametreler ile ilişkisinin olup olmadığını açığa çıkarmak amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: 46 KHL olgusu makrofaj yoğunluğunun araştırılması amacıyla CD68 (PG-M1 ve KP1 klonları) ve CD163 belirteçleri ile immunhistokimya (İHK) yöntemiyle boyanarak boyanma oranı değerlendirilmiş, bu oranların medyan değerlerine göre ve daha az ekspresyonun anlamlı olup olmadığını araştırmaya yönelik kesme değerleri oluşturulmuştur. Kromojen in situ hibridizasyon yöntemiyle (CISH) EBER (Epstein-Barr virus encoded RNA) probu kullanılarak olgularda EBV enfeksiyonu olup olmadığı araştırılmıştır.

BULGULAR: %40 kesme değeriyle CD68 PG-M1 ekspresyonu artışının ve uluslararası prognostik skorun (IPS) yüksek oluşunun genel sağkalım süresini azalttığı görülmüştür (sırasıyla $p=0,047$ ve $p=0,013$). Bunun yanı sıra klinik parametrelerden hastalığın ileri evrede olması, ekstralenfatik tutulumun bulunması, sedimentasyonun 50 üzerinde olması ve olguların EORTC'ye göre kötü risk grubunda yer almasının genel sağkalımı azalttığına yönelik sınırdan anlamlılık gözlenmiştir (sırasıyla $p=0,090$, $p=0,067$, $p=0,073$ ve $p=0,076$). Progresyonsuz sağkalım süresinin uzun olması ile tutulu nodal alan sayısının 3'ün altında olması arasında anlamlı ilişki izlenirken, EBV enfeksiyonu varlığıyla sınırdan anlamlılık saptanmıştır (sırasıyla $p=0,043$ ve $p=0,062$). Ayrıca ekstralenfatik tutulum bulunması ve sedimentasyonun 50

üzerinde olmasının hem genel hem de progresyonsuz sağkalım süresin azalttığı yönünde sınırda anlamlılık gözlenmiştir (sırasıyla $p=0,051$ ve $p=0,090$). Her üç makrofaj belirtecinde yoğunluk artışının, klinikopatolojik parametrelerden B semptom varlığı, dalak tutulumun olması, EORTC'ye göre kötü risk grubu ve EBV enfeksiyonun varlığıyla korelasyon gösterdiği izlenmiştir. Aynı zamanda CD163+ makrofajların artışı ile yüksek IPS, sedimentasyon yüksekliği ve ileri yaş arasında (sırasıyla $p=0,037$, $p=0,017$, $p=0,008$); CD68 PG-M1+makrofaj artışı ile sedimentasyon yüksekliği, erkek cinsiyet ve neoplastik hücrelerin orta/fazla sayıda bulunması arasında (sırasıyla $p=0,038$, $p=0,023$, $p=0,012$) ve CD68 KP1+makrofaj artışıyla yüksek IPS arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,038$). Çok değişkenli analizde her üç belirteç ile EBV enfeksiyonu ve B semptomları arasındaki, CD163 ve CD68 PG-M1 belirteci ile de ek olarak dalak tutulumu arasındaki anlamlı ilişkinin devamlılığı görülmüştür.

SONUÇLAR: Bulgular PG-M1 ile belirlenen TAM yoğunluk artışını daha kısa genel sağkalım süresiyle ilişkili olduğunu gösterirken, diğer iki makrofaj belirteciyle sağkalım arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Ancak her üç makrofaj belirteciyle saptanan TAM artışı ve EBV pozitifliğinin risk gruplarının oluşturulmasında yer alan klinik parametrelerden bazıları ile arasında saptanan anlamlı ilişki, makrofaj yoğunluğunun vurgulanmasının hastaların prognostik risk gruplarının belirlenmesinde kullanılabileceğine ve patoloji raporlarında belirtilmesi gerektiğine işaret etmiştir. Daha kesin sonuçlar alınabilmesi için, konunun daha çok çalışmada, daha geniş ve daha uzun izlem süreli serilerde ele alınmasının gerekli olduğu düşünülmüştür.

ABSTRACT

RELATIONSHIP OF TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGE POPULATION DETECTED BY CD68 PG-M1, CD68 KP1 AND CD163 WITH LATENT EBV INFECTION AND PROGNOSIS IN CLASSICAL HODGKIN'S LYMPHOMA

AIM: Our aim is to evaluate the quantity of tissue associated macrophages (TAM), detected by CD68 PG-M1, CD68 KP1 and CD163 positivity and its correlation between latent EBV infection in neoplastic cells, and to reveal the possible association of overall and progression free survival in cases of Hodgkin's lymphoma of classical type (cHL); to see also whether there is an association with prognostic indices such as International Prognostic Score (IPS) and European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and clinicopathological parameters.

MATERIALS AND METHODS: 46 cases of Hodgkin's lymphoma classical type were selected for evaluation. Staining for CD68 (PG-M1 and KP1 clones) and CD163 immunohistochemistry were evaluated, cut-off values were defined according to median values of staining intensity and ratio. The significance of values lower than median values were also reviewed to determine their statistical importance. Additionally, all cases were evaluated using chromogen in situ hybridization (CISH) method with EBER (Epstein-Barr virus encoded RNA) probes for presence of possible EBV infection.

RESULTS: We found high expression levels of CD68 PG-M1 and high IPS were associated with shortened overall survival ($p=0,047$ and $0,013$, respectively). Association with parameters such as advanced stage disease, presence of extralymphatic involvement, high erythrocyte sedimentation rate ($ESR>50$) and being in the poor risk group for EORTC were also found statistically significant for shortened overall survival ($p=0,090$, $p=0,067$, $p=0,073$ and $p=0,076$ respectively). Cases with 2 or less nodal region involvement have been observed to have longer progression-free survival period, also there was statistically borderline significant association with presence of EBV infection ($p=0,043$ and $p=0,062$ respectively). Presence of extralymphatic involvement and high ESR (>50) were found to shorten progression-free survival as well as overall survival, again in a borderline manner ($p=0,051$ and $p=0,090$ respectively). High expression levels with immunohistochemical markers (CD68 PG-M1, CD68 KP1 and CD163) were found to show association with presence of clinical parameters such as,

presence of B symptoms, spleen involvement, being in the poor risk group for EORTC and presence of EBV infection. High CD163 expression levels were associated with high IPS, high ESR and older age ($p=0,037$, $p=0,017$ and $p=0,008$ respectively). Higher staining intensity with CD68 PG-M1 were associated with high ESR, male sex and neoplastic cell count being intermediate/high ($p=0,038$, $p=0,023$, $p=0,012$, respectively). Higher staining intensity with CD68 KP1 were associated with higher IPS ($p=0,038$). In multivariate analysis, each three markers have also shown significant relevance with presence of EBV infection and B symptoms, while spleen involvement were found to have correlation with CD163 and CD68 PG-M1.

CONCLUSIONS: Our findings suggest that increase of CD68 PG-M1+ TAM with a cut-off point of 40% is associated with shortened overall survival, while the remaining markers were observed to have no such significant association with overall or progression-free survival. Presence of EBV infection and clinical parameters mentioned above and used for determining risk groups, showed significant association with each marker. These findings indicate that highlighting TAM rate via macrophage markers in cases of cHL could be helpful determining prognostic risk groups and should be mentioned in pathology reports. In order to obtain more accurate results, this subject is needed to be evaluated in other studies including larger series with much more longer follow-up periods.

KAYNAKLAR

1. Banerjee D. Recent insights into the biology of Hodgkin's lymphoma. From: cdn.intechopen.com/pdfs-wm/33669.pdf
Accessed: Jan 2015
2. Hummel M. World Health Organization and beyond: New aspects in the pathology of an old disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007;21:769-86
3. Reed DM. On the pathological changes in Hodgkin's disease, with special reference to its relation to tuberculosis *John Hopkins Hosp Rep* 1902;10:133-96
4. Seif GS, Spriggs AI. Chromosome Changes in Hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst* 1967;39:557-70
5. Kapatai G, Murray P, Contribution of Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *J. Clin Pathol* 2007;60:1342-9
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015; 65:5
7. Doll R, Muir C, Waterhouse J, eds. Cancer incidence in five continents, vol.2. Berlin: Springer- verlag, 1970
8. Young JL Jr., Percy C, Asire AJ, et al. Cancer incidence and mortality in the United States. *NCI Monogr* 1981;57:72-84.
9. Wakasa H. Hodgkin's disease in Asia, particularly in Japan. *NCI Monogr* 1973;36:15-23
10. Bray F., et al., Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer*, 2002. 38(1): p. 99-166.
11. Correa P, O'Connor GT. Geographic pathology of lymphoreticular tumors: summary of survey from the Geographic Pathology Committee of the International Union against Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1973;50:1609-1617
12. Correa P, O'Connor GT. Epidemiologic pattern of Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 1971;8:192-201
13. Mac Mahon B. Epidemiology of Hodgkin's disease. *Cancer Res* 1966;26:1189-1200
14. Desforges JF, Rutherford CJ, Piro A. Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1979;301:1212-1222
15. Dorfman RF. Relationship of histology to site in Hodgkin's disease. *Cancer Res* 1971;31:1786-1793
16. Jermal A, Murray T, Samuels A, et al. Cancer Statistics 2003. *CA Cancer J Clin* 2003;53:5-26

17. Beral V, Newton R. Overview of the epidemiology of immunodeficiency-associated cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;23:1
18. Ioachim HL. New vistas in Hodgkin's disease. *Pathol Annu* 1975;10:419-459.
19. Chang, E.T., et al., Family history of hematopoietic malignancy and risk of lymphoma. *J Natl Cancer Inst*, 2005. 97(19): p. 1466-74.
20. Freedman, L.S., et al., A comparison of population-based cancer incidence rates in Israel and Jordan. *Eur J Cancer Prev*, 2003. 12(5): p. 359-65.
21. Goldin, L.R., et al., A genome screen of families at high risk for Hodgkin lymphoma: evidence for a susceptibility gene on chromosome 4. *J Med Genet*, 2005. 42(7): p.595-601.
22. Oza, A.M., et al., A clinical and epidemiological study of human leukocyte antigen- DPB alleles in Hodgkin's disease. *Cancer Res*, 1994. 54(19): p. 5101-5.
23. Glaser, S.L., et al, Social class and risk of Hodgkin's disease in young-adult women in 1988-94. *Int J Cancer*, 2002. 98(1): p. 110-7.
24. Hjalgrim, H, et al, Risk of Hodgkin's disease and other cancers after infectious mononucleosis. *J Natl Cancer Inst*, 2000. 92(18): p. 1522-8.
25. Hjalgrim H, Askling J, Rostgaard K, et al. Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. *N Engl J Med* 2003;349:1309-11
26. Trimeche M, Bonnet C, Korbi J. Association between Epstein-Barr virus and Hodgkin's lymphoma in Belgium: a pathological and virological study. *Leul Lymphoma* 2007;48:1323-1331
27. Vassallo J, Brousser P, Knecht H. Detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Appl Immunohistochem* 1993;1:213-219
28. Lacroix A, Jaccard A, Rouzioux C. HHV-6 and EBV DNA quantitation in lymph nodes of 86 patients with Hodgkin's lymphoma. *J Med Virol* 2007; 79:1349-56
29. Jarrett RF, Gallagher A, Jones DB. Detection of Epstein- Barr virus genomes in Hodgkin's disease:relation to age. *J Clin Pathol* 1991;44:844
30. Farrel PJ. Role for HLA in susceptibility to infectious mononucleosis. *J Clin Invest* 2007;117:2756-8
31. Niens M, Jarrett RF, Hepkema B, et al. HLAA02 is associated with a reduced risk and HLA- A01 with an increased risk of developing EBV+ Hodgkin lymphoma. *Blood* 2007;110:3310–15.

32. Lam N, Sugden B: CD40 and its viral mimic, LMP-1: similar means to different ends. *Cell Signal* 15:9, 2003
33. Thorley-Lawson DA: Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* 1:75, 2001
34. Cabannes E, et al: Mutations in the I κ B α gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I κ B α . *Oncogene* 18:3063, 1999
35. Bechtel D, Kurth J, Unkel C, Küppers R. Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. *Blood*. 2005;106 (13):4345-4350
36. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1989;320:502-506
37. Poppema S, van Imhoff G, Torensma R, Smit J. Lymphadenopathy morphologically consistent with Hodgkin's disease associated with Epstein-Barr virus infection. *Am J Clin Pathol*. 1985 Sep;84(3):385-90
38. Ohshima K, Ishiguro M, Ohgami A, Sugihara M, Haraoka S, Suzumiya J, Kikuchi M Genetic analysis of sorted Hodgkin and Reed-Sternberg cells using comparative genomic hybridization. *Int J Cancer*. 1999 Jul 19;82(2):250-5.
39. Gulley ML: Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *J Mol Diagn*. 3:1–10. 2001.
40. Qi ZL, Han XQ, Hu J, Wang GH, Gao JW, Wang X, Liang DY. Comparison of three methods for the detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin's lymphoma in paraffin-embedded tissues. *Mol Med Rep*. 2013 Jan;7(1):89-92
41. Lauritzen AF, Hørting U, Nielsen HW. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: a comparative immunological, in situ hybridization, and polymerase chain reaction study *APMIS*. 1994 Jul;102(7):495-500.
42. Herndier BG, Sanchez HC, Chang KL. High prevalence of Epstein-Barr virus in the Reed-Sternberg cells of HIV-associated Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1993;142:1073.
43. Bellas C, Santon A, Manzanal A. Pathological, immunological and molecular features of Hodgkin's disease associated with HIV infection: comparison with ordinary Hodgkin's disease. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1520-1524
44. Thompson LD, Fisher SI, Chu WS. HIV-associated Hodgkin lymphoma: a clinicopathologic and immunophenotypic study of 45 cases. *Am J Clin Pathol* 2004;121:727-38

45. Adami J et al., Cancer risk following organ transplantation: a nationwide cohort study in Sweden. *Br J Cancer*, 2003. 89(7): p. 1221-7.
46. Ekstrom, K., et al., Risk of malignant lymphomas in patients with rheumatoid arthritis and in their first-degree relatives. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(4): p. 963-70.
47. Landgren O, Engels EA, Pfeiffer RM, et al. Autoimmunity and susceptibility to Hodgkin lymphoma: a population-based case-control study in Scandinavia. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:1321–1330
48. Landgren, O., et al., Personal and family history of autoimmune diabetes mellitus and susceptibility to young-adult-onset Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*, 2006. 118(2): p. 449-52.
49. Glaser, S.L., et al., Smoking and Hodgkin lymphoma risk in women United States. *Cancer Causes Control*, 2004. 15(4): p. 387-97.
50. Warnke RA, Weiss LM, Chan JK. Classic Hodgkin's disease. In: *Atlas of tumor pathology. Series III, fascicle 14. Tumors of the lymph nodes and spleen*. Washington, CD: Armed Forces Institute of Pathology, 1995:227-304
51. Strum SB, Park JK, Rapaport H. Observations of cells resembling Reed-Sternberg cells in conditions other than Hodgkin disease. *Cancer* 1970;26:176-190
52. Anagnostou D, Parker JW, Taylor CR. Lacunar cells of nodular sclerosing Hodgkin's disease. *Cancer* 1977;39:1032-1043
53. Rappaport H. Tumors of the hematopoietic system. In *Atlas of tumor pathology, fascicle 8*. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1966:188-193.
54. Kadin ME, Stites DP, Levy R. Exogenous immunoglobulin and the macrophage origin of Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1978; 299:1208-1214
55. Marafioti T, Hummel M, Foss HD. Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood* 2000;95:1443-1450
56. Tzankov A, Dirnhofer S. Pathobiology of classical Hodgkin lymphoma. *Pathobiology* 2006;73:107-125
57. Schwering I, et al. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003;101(4):1505–1512.

58. Stein H, et al. Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood*. 2001;97(2):496–501
59. Torlakovic E, Tierens A, Dang HD, Delabie J. The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's disease. *Am J Pathol*. 2001;159(5):1807–1814.
60. Jundt F, et al. Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia*. 2008;22(8):1587–1594
61. Renné C, et al. Aberrant expression of ID2, a suppressor of B-cell-specific gene expression, in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol*. 2006; 169(2):655–664.
62. Mathas S, et al. Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nat Immunol*. 2006; 7(2):207–215.
63. Jundt F, Acikgoz O, Kwon SH, et al. Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 2008;22:1587–1594.
64. Dukers DF, et al. Unique polycomb gene expression pattern in Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's lymphoma-derived cell lines. *Am J Pathol*. 2004;164(3):873–881.
65. Raaphorst FM, et al. Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb group genes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Am J Pathol*. 2000;157(3):709–715.
66. Weber-Matthiesen K, Deerberg J, Poetsch M, Grote W, Schlegelberger B. Numerical chromosome aberrations are present within the CD30+ Hodgkin and Reed-Sternberg cells in 100% of analyzed cases of Hodgkin's disease. *Blood*. 1995;86(4):1464–1468
67. Martin-Subero JI, et al. Chromosomal breakpoints affecting immunoglobulin loci are recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Cancer Res*. 2006; 66(21):10332–10338
68. Joos S, et al. Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood*. 2002;99(4):1381–1387.

69. Martin-Subero JI, et al. Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2002;99(4):1474–1477.
70. Otto C, et al. Genetic lesions of the TRAF3 and MAP3K14 genes in classical Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. 2012;157(6):702–708.
71. Emmerich F, et al. Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood*. 1999;94(9):3129–3134
72. Emmerich F, et al. Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *J Pathol*. 2003;201(3):413–420.
73. Kato M, et al. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*. 2009;459(7247):712–716.
74. Schmitz R, et al. TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med*. 2009;206(5):981–989
75. Schmidt A, et al. Rare occurrence of biallelic CYLD gene mutations in classical Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010;49(9):803–809.
76. Martin-Subero JI, et al. Chromosomal rearrangements involving the BCL3 locus are recurrent in classical Hodgkin and peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2006;108(1):401–402.
77. Scheeren FA, Diehl SA, Smit LA, et al. IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5; evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis. *Blood* 2008;111:4706–4715.
78. Kapp U, Yeh WC, Patterson B, et al. Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med* 1999;189:1939–1946
79. Joos S, et al. Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. *Cancer Res*. 2000;60(3):549–552.
80. Van Roosbroeck K, et al. JAK2 rearrangements, including the novel SEC31A-JAK2 fusion, are recurrent in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2011;117(15):4056–4064.
81. Weniger MA, et al. Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene*. 2006;25(18):2679–2684
82. Renné C, Willenbrock K, Küppers R, Hansmann ML, Bräuninger A. Autocrine and paracrine activated receptor tyrosine kinases in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2005;105(10):4051–4059
83. Carbone A, Gloghini A, Gruss HJ, Pinto A. CD40 ligand is constitutively expressed in a subset of T cell lymphomas and on

- the microenvironmental reactive T cells of follicular lymphomas and Hodgkin's disease. *Am J Pathol.* 1995;147(4):912–922.
84. Nozawa Y, Wakasa H, Abe M. Costimulatory molecules (CD80 and CD86) on Reed-Sternberg cells are associated with the proliferation of background T cells in Hodgkin's disease. *Pathol Int.* 1998;48(1):10–14.
 85. Marshall NA, et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2004; 103(5):1755–1762
 86. Ma Y, van den Berg A, Atayar C, et al. Cytokines, cytokine receptors, and chemokines in Hodgkin lymphoma. In: Hoppe RT, Mauch PM, Armitage JO, Diehl V, Weiss LM, eds. *Hodgkin lymphoma.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007:87–98.
 87. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004;103:1755–1762.
 88. Gandhi MK, Lambley E, Duraiswamy J, et al. Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8+ T-cell function in Hodgkin lymphoma patients. *Blood* 2006;108:2280–2289.
 89. Küppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer* 2009;9:15–27.
 90. Schwering I, Bräuninger A, Klein U, et al. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003;101:1505–1512.
 91. Foss HD, Reusch R, Demel G, et al. Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin. *Blood* 1999;94:3108–3113.
 92. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *Classification of tumours of haemato-poietic and lymphoid tissues.* Lyon: IARC Press, 2008:323–325.
 93. Schmid C, Sargent C, Isaacson PG. L and H cells of nodular lymphocyte predominant Hodgkin's disease show immunoglobulin light-chain restriction. *Am J Pathol* 1991;139:1281–1289.
 94. Steimle-Grauer SA, Tinguely M, Seada L, et al. Expression patterns of transcription factors in progressively transformed germinal centers and Hodgkin lymphoma. *Virchows Arch* 2003;442:284–293.
 95. Brune V, Tiacchi E, Pfeil I, et al. Origin and pathogenesis of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma as revealed by global gene expression analysis. *J Exp Med* 2008;205:2251–2268.

96. Tedoldi S, Mottok A, Ying J, et al. Selective loss of B-cell phenotype in lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *J Pathol* 2007;213:429–440.
97. Nam-Cha SH, Roncador G, Sanchez-Verde L, et al. PD-1, a follicular T-cell marker useful for recognizing nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2008;32:1252–1257.
98. Schnitzer B, Hodgkin Lymphoma in Hsi E.D. (2nd ed) Hematopathology 2012.
99. Jackson H Jr, Parker F Jr. Hodgkin's disease. I. General consideration. *N Engl J Med* 1944;230:1-8.
100. Lukes RJ, Butler JJ. The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. *Cancer Res* 1966;26:1063-1083.
101. Mason DY, Banks PM, Chan J, et al. Nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. A distinct clinicopathological entity. *Am J Surg Pathol* 1994;18:526-530.
102. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms; a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84:1361-139
103. Stein H, Delsol G, Pileri SA, et al. Classical Hodgkin lymphoma, introduction in Swerdlow SH, Campo E, Harris NL (eds), et al. *WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC; 2008. p. 326-9.
104. Harris, N.L., Hodgkin's lymphomas: classification, diagnosis, and grading. *Semin Hematol*, 1999. 36(3): p. 220-32.
105. Khoury JD, Jones D, Yared MA, et al. Bone marrow involvement in patients with nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2004;28:489-495.
106. Novoga L, Rudiger T, Engert A. Biology, clinical course and management of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006;266-272.
107. Brune V, Tiacchi E, Pfeil I, et al. Origin and pathogenesis of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma as revealed by global gene expression analysis. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205:2251–2268.
108. Kaplan HS. Hodgkin's disease. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1972.
109. Guermazi A, et al. Extranodal Hodgkin Disease: Spectrum of Disease 1. *Radiographics*, 2001. 21(1): p. 161-179
110. Warnke RA, Weis LM, Chan JK, et al. Classic Hodgkin's disease. In: *Atlas of tumor pathology. Series III, fascicle 14. Tumors of the lymph nodes and spleen*. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1995:277-304.
111. Dorfman RF. Relationship of histology to site in Hodgkin's disease. *Cancer Res* 1971;31:1786-1793
112. Diehl V, Sextro M, Franklin J, et al. Clinical presentation course, and prognostic factors in lymphocyte-predominant Hodgkin's

- disease and lymphocyte-rich classical Hodgkin's disease: report from the European Task Force on Lymphoma Project on lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 1999;17:776-783.
113. Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002;99:4238-4297
 114. Kant JA, Hubbard SM, Longo DL. The pathologic and clinical heterogeneity of lymphocyte-depleted Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 1986;4:284-294.
 115. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol.* 1989;7:1630-6.
 116. El-Galaly TC, d'Amore F, Mylam KJ, de Nully Brown P, Bogsted M, Bukh A, et al. Routine bone marrow biopsy has little or no therapeutic consequence for positron emission tomography/computed tomography-staged treatment-naive patients with Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol.* 2012;30:4508-14.
 117. Hoppe RT, Mauch PM, Armitage JO, et al., eds. Hodgkin lymphoma, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
 118. Connors JM. State-of-the-art therapeutics: Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2005;23:6400–6408.
 119. Ansell SM, Armitage JO. Management of Hodgkin lymphoma. *Mayo Clin Proc* 2006;81:419–426.
 120. Hoppe RT, Advani RH, Ai WZ, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: Hodgkin lymphoma 2012 v.2. www.nccn.org; 2012.
 121. Hoppe RT, Advani RH, Ai WZ, et al. Hodgkin lymphoma. *J Natl Compr Canc Netw* 2011;9:1020–1058.
 122. Eichenauer DA, Engert A, Dreyling M. Hodgkin's lymphoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2011;22(Suppl 6):vi55–vi58.
 123. Tur MK, Neef I, Jäger G, Teubner A, Stöcker M, Melmer G, Barth S. Immunokines, a novel class of immunotherapeutics for targeted cancer therapy. *Curr Pharm Des.* 2009;15(23):2693-9. Review.
 124. NCCN Guidelines Version 2.2014, Hodgkin Lymphoma, 'Examples Unfavorable Risk Factors for Stage I-II Hodgkin Disease', HODG-A, www.nccn.org.
 125. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med.* 1998;339:1506-14.
 126. Ree HJ, Kadin ME. Macrophage-histiocytes in Hodgkin's disease. The relation of peanut-agglutinin-binding macrophage-histiocytes to clinicopathologic presentation and course of disease. *Cancer.* 1985;56:333-8.

127. Devilard E, Bertucci F, et al. Gene expression profiling defines molecular subtypes of classical Hodgkin's disease. *Oncogene*. 2002 May 2;21(19):3095-102
128. Sánchez-Aguilera A, Montalbán C, et al. Spanish Hodgkin Lymphoma Study Group. Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006 Jul 15;108(2):662-8. Epub 2006 Mar 21.
129. Chetaille B, Bertucci F, et al. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood*. 2009 Mar 19;113(12):2765-3775.
130. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, Bosch R, Garcia JF, Jaen J, et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res*. 2005;11:1467-73.
131. Tzankov A, Meier C, et al. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2008;93:193-200.
132. Condeelis, J., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124, 263–266.
133. Pollard, J.W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 4, 71–78.
134. Dave SS, Wright G, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*. 2004 Nov 18;351(21):2159-69.
135. Kamper P, Bendix K, Hamilton-Dutoit S, Honoré B, Nyengaard JR, d'Amore F. Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2011 Feb;96(2):269-76.
136. Steidl C, Lee T, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2010 Mar 11;362(10):875-85.
137. Zanotti R, Trolese A, et al. Serum levels of soluble CD30 improve International Prognostic Score in predicting the outcome of advanced Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 2002 Dec;13(12):1908-14.
138. Casasnovas RO, Mounier N, et al. Plasma cytokine and soluble receptor signature predicts outcome of patients with classical Hodgkin's lymphoma: a study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol*. 2007 May 1;25(13):1732-40. Epub 2007 Mar 26.
139. Rassidakis GZ, Medeiros LJ, et al. BCL-2 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease predicts a poorer prognosis in patients treated with ABVD or equivalent regimens. *Blood*. 2002 Dec 1;100(12):3935-41.

140. Häusler M, Scheithauer S, Ritter K, Kleines M. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus. *Expert Rev Mol Diagn.* 2003 Jan;3(1):81
141. Ljubomir R. Jakovic, Biljana S. Mihaljevic, Maja D. Perunicic Jovanovic, Andrija D. Bogdanovic, Bosko M. Andjelic & Vladimir Z. Bumbasirevic The prognostic relevance of tumor associated macrophages in advanced stage classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, October 2011; 52:10, 1913-1919.
142. Panico L, Ronconi F, Lepore M, Tenneriello V, Cantore N, Dell'Angelo AC, Ferbo U, Ferrara F. Prognostic role of tumor-associated macrophages and angiogenesis in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2013 Nov;54(11):2418-25
143. Zaki MA, Wada N, Ikeda J, Shibayama H, Hashimoto K, Yamagami T, et al. Prognostic implication of types of tumor-associated macrophages in Hodgkin lymphoma. *Virchows Arch.* 2011;459(4):361–6.
144. Azambuja D, Natkunam Y, Biasoli I, Lossos IS, Anderson MW, Morais JC, Spector N. Lack of association of tumor-associated macrophages with clinical outcome in patients with classical Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* 2012 Mar;23(3):736-42. doi: 10.1093/annonc/mdr157. Epub 2011 May 20.
145. Sánchez-Espiridión B, Martín-Moreno AM, Montalbán C, Medeiros LJ, Vega F, Younes A, Piris MA, Garcia JF. Immunohistochemical markers for Tumor-associated macrophages and survival in advanced classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica.* 2012 Jul;97(7):1080-4. doi: 10.3324/haematol.2011.055459. Epub 2012 Feb 7. 1
146. Casulo C, Arcila M, Bohn OL, Teruya-Feldstein J, Maragulia J, Moskowitz CH. Tumor associated macrophages in relapsed and refractory Hodgkin lymphoma *Leuk Res.* 2013 Sep;37(9):1178-83.
147. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 1996;56(20):4625-9.
148. Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 2008; 222:155-61.
149. Solinas G, Schiarea S, Liguori M *et al.* Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor: a new marker for M2-polarization, influencing tumor cell motility. *J Immunol* 2010;185:642–52.
150. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010;141(1):39-51. 1
151. Beck AH, Espinosa I, Edris B *et al.* The macrophage colony-stimulating factor 1 response signature in breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15:778–87.

152. Harris JA, Jain S, Ren Q, Zarineh A, Liu C. CD163 versus CD68 in tumor associated macrophages of classical hodgkin lymphoma *Diagn Pathol.* 2012; 7: 12. Published online 2012 Jan 30. doi: 10.1186/1746-1596-7-1.
153. Lee CH, Espinosa I, Vrijaldenhoven S, Subramanian S, Montgomery KD, Zhu S, et al. Prognostic significance of macrophage infiltration in leiomyosarcomas. *Clin Cancer Res.* 2008;14(5):1423-30.
154. Yoon DH, Koh YW, Kang HJ, Kim S, Park CS, Lee SW, Suh C, Huh J. CD68 and CD163 as prognostic factors for Korean patients with Hodgkin lymphoma. *Eur J Haematol.* 2012 Apr;88(4):292-305
155. Kayal S, Mathur S, Karak AK, Kumar L. CD68 tumor-associated macrophage marker is not prognostic of clinical outcome in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2014 May;55(5):1031-7
156. Tan KL, Scott DW, Hong F, Kahl BS, Fisher RI, Bartlett NL, et al. Tumor-associated macrophages predict inferior outcomes in classic Hodgkin lymphoma: a correlative study from the E2496 Intergroup trial. *Blood.* 2012;120(16):3280–7.
157. Abdou AG, Asaad NY, Loay I, Shabaan M, Badr N. The prognostic role of tumor-associated macrophages and dendritic cells in classic Hodgkin's lymphoma. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2013;32(4):289–305.
158. Koh YW, Park CS, Yoon DH, Suh C, Huh J. CD163 expression was associated with angiogenesis and shortened survival in patients with uniformly treated classical Hodgkin lymphoma. *PLoS One.* 2014;9(1):e87066.
159. Jakovic LR, Mihaljevic BS, Andjelic BM, Bogdanovic AD, Perunicic Jovanovic MD, Babic DD, et al. Prognostic value of lymphocyte/monocyte ratio in advanced Hodgkin lymphoma: correlation with International Prognostic Score and tumor associated macrophages. *Leuk Lymphoma.* 2016;57(8):1839–47.
160. Touati M, Delage-Corre M, Monteil J, Abraham J, Moreau S, Remenieras L, et al. CD68-positive tumor-associated macrophages predict unfavorable treatment outcomes in classical Hodgkin lymphoma in correlation with interim fluorodeoxyglucose-positron emission tomography assessment. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(2):332–41.
161. Tzankov A, Matter MS, Dirnhofer S. Refined prognostic role of CD68-positive tumor macrophages in the context of the cellular micromilieu of classical Hodgkin lymphoma. *Pathobiology.* 2010;77(6):301-8
162. Jakovica LR, Mihaljevic BS, Jovanovic MDP, Bogdanovic AD. Prognostic Significance of Bcl-2, Tumor-Associated Macrophages, and Total Neoplastic and Inflammatory Lymph Node Involvement in Advanced Stage Classical Hodgkin's Lymphoma. *Onkologie* 2012;35:733-739

163. Agur A, Amir G, Paltiel O, Klein M, Dann EJ, Goldschmidt H, Goldschmidt N. CD68 staining correlates with the size of residual mass but not with survival in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2015 May;56(5):1315-9.
164. Kapatai G, Murray P. Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *J Clin Pathol*. 2007;60:1342- 1349.
165. Baumforth KR, Birgersdotter A, Reynolds GM, Wei W, Kapatai G, Flavell JR, et al. Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates upregulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. *Am J Pathol*. 2008;173 (1):195-204.

