

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMA ALT
TIPLERİNDE COX-2, SURVİVİN, KI-67, BCL-2,
CD3 EKSPRESYONU VE PROGNOZ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

DR. ÜLKÜ KÜÇÜK

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2006

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMA ALT
TIPLERİNDE COX-2, SURVİVİN, KI-67, BCL-2,
CD3 EKSPRESYONU VE PROGNOZ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ÜLKÜ KÜÇÜK

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	1
TEŞEKKÜR.....	2
TÜRKÇE ÖZET.....	3-4
İNGİLİZCE ÖZET.....	5-6
GİRİŞ.....	7-22
GEREÇ VE YÖNTEM.....	22-29
BULGULAR.....	29-40
TARTIŞMA.....	41-51
SONUÇ.....	52
KAYNAKLAR.....	53-62

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması sürecinde derin bilgi birikimi ve tecrübesiyle bana rehberlik eden tez danışmanım Prof. Dr Aydanur Kargı başta olmak üzere, değerli öğretim üyeleri Prof.Dr. M.Şerefettin Canda, Prof.Dr. Tülay Canda, Prof.Dr. A.Ali Küpelioğlu, Prof.Dr. H.Uğur Pabuçcuoğlu, Prof.Dr. Kutsal Yörükoğlu, Prof.Dr. Meral Koyuncuoğlu, Prof.Dr. Sülen Sarıoğlu, Prof. Dr. Erdener Özer, Prof.Dr. Özgül Sağol, Doç.Dr. Banu Lebe, Doç. Dr. Sermin Özkal, Doç.Dr. Burçin Tuna, Doç.Dr. Çağnur Ulukuş, Öğr. Gör. Duygu Gürel ve Uzm.Dr Mehtat Ünlü' ye asistanlığım süresince anlayış ve sabır içerisinde eğitimime buldukları katkıdan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin istatistiksel analizindeki yardımlarından dolayı Halk Sağlığı Anabilimdalı'ndan Dr. Hatice Giraya'a ayrıca bu günlere gelmemi sağlayan ve desteklerini hiç esirgemeyen aileme, asistanlığım süresince ve tezimin hazırlanması aşamasında vermiş olduğu destekten dolayı sevgili eşime, sabrı ve anlayışı için canım kızıma ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

”Diffüz büyük B hücreli lenfoma alt tiplerinde COX-2, survivin, Ki-67, bcl-2, CD3 ekspresyonu ve prognoz üzerine etkileri”

Dr Ülkü Küçük

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.D.

İnciraltı/ İZMİR

Amaç ve hipotez: Son zamanlarda diffüz büyük B hücreli lenfomalarda COX-2 ve survivin ekspresyonunun kötü prognostik faktör olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada DBBHL'ların germinal merkez kaynaklı, nongerminal merkez kaynaklı ve sınıflandırılmayan alt tiplerinde CD3, bcl-2, Ki-67, COX-2 ve survivin proteinlerinin ekspresyonları ve bu ekspresyonların prognoz üzerine etkisi araştırılmıştır.

Yöntem: 1990-2006 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesi'nde diffüz büyük B hücreli lenfoma tanısı almış ve klinik takipleri olan 50 hasta araştırmaya alınmıştır. Olgularda B hücre fenotipi immünohistokimyasal yöntemle CD20 pozitivitesi gösterilerek doğrulanmıştır. Bu olgular arasından immünohistokimyasal yöntemle CD10 ve/veya bcl-6 ile olumlu, MUM-1 ile olumsuz boyananlar, germinal merkez kaynaklı olarak, CD10 ve bcl-6 ile olumsuz, MUM 1 ile olumlu boyanan olgular yanı sıra CD10 olumsuz, bcl-6 ve MUM-1 olumlu olgular nongerminal merkez kaynaklı olarak kabul edilmiştir. Bu üç belirleyicinin hiç biri ile boyanma göstermeyen olgular ise sınıflandırılmayan gruba alınmıştır. Böylece olgular germinal merkez kaynaklı (n.16), nongerminal merkez kaynaklı (n:26) ve sınıflandırılmayan (8) olmak üzere üç ana alttipe ayrılmıştır. Daha sonra belirlenen alt gruplarda immünohistomiyasal yöntemle CD3, COX-2, survivin, Ki-67 ve bcl-2 ekspresyonu ve bunların prognozla ilişkisi araştırılmıştır.

Bulgular: Araştırmada 27 erkek (%54) ve 23 kadın (%46) hasta değerlendirilmiştir. Hastaların genel yaş ortalaması 57.6 dır (17-95). Yaşayan olguların ortalama takip süresi 52 aydır (median: 39 ay, aralık:10-160 ay).

Hastalığın prognozunu etkilediği bildirilen etmenlerin tek tek değerlendirildiği Log Rank Analizi sonuçlarına göre, yaşı 65 altında olanlarda ve kadın hastalarda sağkalım anlamlı olarak daha fazladır (p=0.03 ve p=0.05). Diğer değişkenlerin sağkalım üzerine anlamlı etkisi saptanmamıştır.

Olası karıştırıcı etmenlerin etkisini düzeltmek için yapılan Cox regresyon analizine göre ileri yaş ($p=0.001$), cinsiyet ($p=0.017$) ve diffüz büyük B hücreli lenfoma alttipleri'nin ($p=0.005$) sağkalım üzerine anlamlı etkisinin olduğu saptanmıştır.

Diffüz büyük B hücreli lenfoma alttipleri arasında COX-2, survivin, bcl-2, Ki-67 ve CD3 ekspresyonu açısından fark olup olmadığını belirlemek için kullandığımız Çok Gözlü Düzlemlerde Ki-Kare analizine göre diffüz büyük B hücreli lenfoma alttipleri arasında COX-2, survivin, bcl-2, Ki-67 ve CD3 ekspresyonları açısından anlamlı fark olmadığı saptanmıştır.

Sonuç: Bu araştırmada diffüz büyük B hücreli lenfoma hastalarında yaş, cinsiyet ve DBBHL alttiplerinin sağkalım üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. Tümör zemininde eşlik eden inflamatuvar yanıtın yoğunluğunun, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, toplam sağkalım üzerine etkisinin olabileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte belirlenen diffüz büyük B hücreli lenfoma alttipleri arasındaki (germinal merkez kaynaklı, nongerminal merkez kaynaklı, sınıflandırılmayan grup) bu belirgin prognoz farkını açıklayabilmek için alttipler arasında COX-2, survivin, Ki-67, bcl-2 ve CD3 ekspresyonu açısından fark olup olmadığına bakıldığında gruplar arasında anlamlı fark izlenmemiştir. Bu da bize alttipler arasındaki prognoz farkının nedenini açıklayabilmek için apoptoz, proliferasyon hızı ve inflamatuvar cevap dışında farklı mekanizmaların olabileceğini ve bunları saptamak için daha fazla araştırma gerektiğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Diffüz büyük B hücreli lenfoma, germinal merkez kaynaklı, nongerminal merkez kaynaklı, COX-2, survivin, bcl 2, ki-67, CD3

SUMMARY

“Expression of COX-2, survivin, Ki-67, BCL-2, CD3 in diffuse large B-cell lymphoma subtypes and their effects on prognosis “

Dr Ülkü Küçük

Dokuz Eylül University Medical Faculty Pathology Department

İnciraltı/İzmir

Purpose : Recent studies demonstrate that COX-2 and survivin expressions are poor prognostic factors in diffuse large B-cell lymphomas. In our study, we investigated CD3, bcl-2, Ki-67, COX-2 and survivin expressions and their role on the prognosis of germinal center B-cell like, non-germinal center B-cell like and unclassified subtypes of diffuse large B-cell lymphoma.

Materials and methods: 50 patients who had diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma and clinical survival data admitted between 1990-2006 in Dokuz Eylül University Medical Faculty Hospital were included in this study. The diagnosis is confirmed by CD20 immunopositivity. In these patients; CD10 (+) and/or bcl-6 (+), MUM-1 (-) patients were diagnosed as germinal center B-cell like, whereas those with MUM-1 (+), CD10 and bcl-6(-) as well as CD10 (-), bcl-6 and MUM-1 (+) as non-germinal center B-cell like. The unclassified group consisted of the patients who were negative with all three immunostains. With this method the patients were divided in three subtypes; germinal center B-cell like (n:16), non-germinal center B-cell like (n:26) and unclassified (n:8). In these subgroups, we investigated CD3, COX-2, survivin, Ki-67 and bcl-2 expressions by immunohistochemistry and their roles on prognosis.

Results: The study group comprised 50 patients with DLBCL, including 27 (54%) males and 23 (46%) females. The patients' ages ranged from 17 to 95 years (mean 57.6). Median follow-up was 52 months (range, 10-160).

With Long Rank analysis, survival is significantly better in the patients over 65 years old and in women (p:0,03 and p:0,05). There are no significant effects of the other factors on survival. With Cox regression analysis; older age (p:0.001), gender (p:0,07) and the subtypes of diffuse large B-cell lymphomas (p:0,005) are significantly

effective on survival. With Chi-square analysis; no significant difference in expression of COX-2, survivin, Ki-67 and CD3 between subtypes of diffuse large B-cell lymphoma.

Conclusion: We found that, age, gender and subtypes of diffuse large B-cell lymphoma over effective on overall survival. Although it is not statistically significant the intensive inflammatory reaction in the tumor may be effective on survival. Between diffuse large B-cell lymphoma subtypes there were no difference in expression of COX-2, survivin, Ki-67, bcl-2 and CD3. It appears that COX-2, survivin, Ki-67, bcl-2 and CD3 are not responsible for the survival difference among subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. There might be some other mechanisms and further investigations need to explain prognostic difference between subtypes of diffuse large B-cell lymphoma.

Key word: Diffuse large B-cell lymphoma, germinal center B-cell like, nongerminal center B-cell like, COX-2, survivin, bcl 2, ki-67, CD3

GİRİŞ

Non-Hodgkin Lenfomalar Hakkında Genel Bilgi: Lenfoma neoplastik hücrelerin kitle oluşturacak şekilde proliferasyonudur. Amerika Birleşik Devletlerinde yılda 55000-60000 kişi Non-Hodgkin Lenfoma tanısı (NHL) almaktadır (1) ve kansere bağlı ölüm sıralamasında 6. sırada bulunmaktadır (2,3). Hastalar arasında yaş, cinsiyet ve ırk dağılımı değişkendir (4,5,6).

Etiopatogenez: Etiolojisi tam aydınlatılamamış olmakla birlikte etiopatogenezinde enfeksiyon, kimyasal ajanlar, genetik bozukluklar, immünyetmezlikler gibi çeşitli faktörler suçlanmıştır (7).

Kronik inflamatuvar hastalıklarda (Sjögren sendromu, çölyak hastalığı, romatoid artrit gibi) artmış NHL riski bilinmektedir (8). Enfeksiyon ajanları ile birlikteliği gösterilen çeşitli NHL tipleri vardır. Helicobacter pylori ile MALT lenfoma arasında (9), Epstein-Barr virus (EBV) ile Burkitt lenfoma arasında, Hepatit C virüs ile splenik ya da büyük hücreli lenfoma arasında, Chlamidia psittaci ile oküler adneksal lenfoma arasındaki artmış birliktelik bunlardan bir kaçıdır (8). Ayrıca Human immunodeficiency virus (HIV) pozitif hastalarda oral kavitede görülen plazmoblastik lenfomalı hastaların bir kısmında da EBV saptanmıştır (10).

İlaca bağlı immünsüpresyon (solid organ transplantasyonları sonrası veya HIV enfeksiyonu sonucu gelişen immünyetmezlik) durumlarında normal popülasyona göre artmış NHL gelişim riski saptanmıştır (11, 12).

Patogenez: Kromozomal translokasyonlar ve moleküler yeniden düzenlenmelerin çoğu lenfomanın patogenezinde önemli rol oynadıkları bilinmektedir ve bunları gösteren analizler tanıyı doğrulamak için sıklıkla kullanılır (8). NHL'a en sık eşlik eden kromozomal anomali; translokasyon t(14;18)(q32;q21) dir. Bu translokasyon folliküler lenfomada (FL) %85, diffüz büyük B hücreli lenfomada (DBBHL) %28 oranında bulunmaktadır (13, 14,15). Bu translokasyon sonucu 18. kromozomdaki bcl-2 geni, kromozom 14 deki immünoglobulin ağır zinciri loküsü ile yan yana gelmektedir ve apoptozise karşı hücrel direnç gelişmektedir (8). Bcl-6 veya c-myc'i içeren moleküler yeniden düzenlenmeler sıklıkla DBBHL'da ve Burkitt lenfomada görülür. Diğer malignitelerde olduğu gibi lenfositlerin malign transformasyonu için genetik anormalliklerin birikimi gereklidir (2).

Non Hodgkin Lenfomalarda Sınıflandırma: 1970'li yıllarda lenfoma için Rappaport sınıflaması, Kiel sınıflaması, Lukes ve Collins sınıflaması gibi birçok değişik sınıflamalar kullanılmıştır.

Güncellenmiş Kiel sınıflaması özellikle Avrupa'da olmak üzere yaygın bir kullanım alanına sahipti. Birçok lenfoma kategorisini ortaya koymada yararlı olmasıyla birlikte, özellikle nodal lenfomalar için yapılmış bir sınıflandırma olup, ektranodal lenfomalar için çok uygun değildi (16).

1981'den sonra Working Formülasyonu lenfoma sınıflaması için yaygın kullanılır hale geldi. Büyüme paterni ve hücre boyutu değerlendirilerek yapıldığı için göreceli olarak uygulaması kolay bir sınıflama idi. Kategorilerin heterojen olması ve immünofenotipin göz önüne alınmaması nedeniyle 1990 ve 2000'lerde yeni sınıflama arayışı başladı (16).

1994 yılında Uluslararası Lenfoma Çalışma Grubu tarafından REAL (Revised European American Lymphoma Listing) yaklaşımı gündeme getirildi. Bu yaklaşım bir sınıflandırma olmaktan ziyade her lenfoma tipinin morfolojik, klinik, immünofenotipik ve genotipik özellikleri ile tek tek ayrı bir antite olarak tanımlanıp listelenmesi prensibine dayanıyordu (16).

REAL yaklaşımının, Working Formülasyonu ve Kiel sınıflamasından diğer önemli bir farkı da morfolojik ve/veya immünolojik olarak ayrılamayan bazı kategorileri tek bir kategori altında toplaması oldu (16).

"Dünya Sağlık Örgütü" sınıflaması (DSÖ) 2001 yılında "International Agency for Research on Cancer" tarafından basılan "Pathology and Genetics" serisinde yayınlandı (Tablo1) (17). DSÖ sınıflaması aslında REAL yaklaşımının güncellenmiş şeklidir. Artan bilgi birikimi ile birlikte REAL sınıflamasında gerekli değişiklikler yapılmıştır. İmmünohistokimyasal çalışmalar antitelerin belirlenmesinde anahtar rolü oynamıştır, klinik bilgi çoğu antitenin tanımlanmasında ayrılmaz bir parça olmuştur. REAL sınıflamasında ayrı birer antite olarak tanımlanabilmesi için yeterli veri bulunmayan ve bu nedenle "geçici" olarak kabul edilen antiteler DSÖ sınıflamasında listelendirilmiştir. Hematolenfoid neoplazmlarının yanı sıra sınıflamada lösemiler, kronik myeloproliferatif hastalıklar ve myelodisplastik sendromlar da yer almıştır (16).

Tablo 1: Dünya Sağlık Örgütü'nün Lenfoid Maligniteler Sınıflaması

Prekürsör B hücreli neoplazmlar

Prekürsör B lenfoblastik lösemi/lenfoma

Matür B hücreli neoplazmlar

Kronik lenfositik lösemi/Küçük lenfositik lenfoma

B hücreli prolenfositik lösemi

Lenfoplazmositik lösemi

Dalağın marjinal zon lenfoması

Ekstranodal marjinal zon B hücreli lenfoma of MALT

Nodal marjinal zon lenfoma

Foliküler lenfoma

Mantle hücreli lenfoma

Diffüz büyük B hücreli lenfoma

Mediastinal (timik) büyük B hücreli lenfoma

İntravasküler büyük B hücreli lenfoma

Primer efüzyon lenfoma

Burkitt lenfoma /lösemi

Hairy hücreli lösemi

Plazma hücreli myelom

Kemiğin soliter plazmositomu

Malignite potansiyeli kesin olmayan B hücre proliferasyonları

Lenfomatoid granulomatozis

Polimorfik, transplantasyon sonrası lenfoproliferatif hastalıklar

Prekürsör T hücreli neoplazmlar

Prekürsör T hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma

Blastik NK hücreli lenfoma

Matür T hücreli ve NK hücreli neoplazmlar

T hücreli prolenfositik lösemi

T hücreli büyük granüler lenfositik lösemi

Agresif NK hücreli lösemi

Erişkin T hücreli lösemi/lenfoma
Ekstranodal T/NK hücreli lenfoma, burun tipi
Enteropati tip T hücreli lenfoma
Hepatosplenik T hücreli lenfoma
Cilt altı pannikülit benzeri T hücreli lenfoma
Mycosis fungoides ve Sezary sendromu
Derinin primer anaplastik büyük hücreli lenfoması
Spesifiye edilemeyen, periferel T hücreli lenfoma
Anjoimmünoblastik T hücreli lenfoma
Anaplastik büyük hücreli lenfoma
Malignite potansiyeli kesin olmayan T hücre proliferasyonlar
Lenfomatoid papulozis

Diffüz büyük B hücreli non-Hodgkin lenfoma

NHL'in en sık görülen tipi olan diffüz büyük B hücreli non-Hodgkin lenfoma (DBBHL), büyük neoplastik B lenfoid hücrelerin diffüz proliferasyonudur (2,18). Büyük hücreli lenfomaların %50-60'ı B hücrelerinden gelişirken, %5-15'i T hücrelerinden gelişir. Geri kalanında ise T ya da B hücre belirleyicisi içermez ve "Null lenfoma" olarak adlandırılır (19). Yapılan gen çalışmalarında Null lenfomaların çoğunun B hücre özelliğinde olduğu gösterilmiştir (20).

DBBHL'ların ABD'de yıllık insidansı 25000 dir (21). Batı ülkelerinde erişkin NHL'in %30-40'ını oluşturur. Japonya'da yapılan bir yayına göre 3194 lenfomalı hastanın yaklaşık %33,3'ünü, gelişen ülkelerde ise lenfomaların büyük kısmını oluşturur (22,17).

Çocuklarda ve gençlerde de görülebilmesine rağmen, sıklıkla erişkinlerde görülür (23). Ortalama görülme yaşı 70'dir ve erkeklerde bayanlara göre biraz daha fazla görülür (17).

Working formulasyona göre intermediate prognostik derece içinde sayılırken, REAL ve DSÖ sınıflamasında ise prognozunun tedavi edilmediği taktirde agresif olduğu bildirilmiştir (21).

DSÖ sınıflamasında daha önceki sınıflandırmalarda yer almayan ya da DBBHL içerisinde değerlendirilen mediastinal (timik) büyük B hücreli lenfoma, intravasküler büyük B hücreli lenfoma ve primer efüzyon lenfoması DBBHL'dan ayrı antiteler olarak tanımlanmıştır (10).

DBBHL, sıklıkla de novo olarak ortaya çıkar fakat bazen küçük lenfositik lenfoma, folliküler lenfoma, marjinal zon lenfoma, nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfomadan da DBBHL'a transformasyon olabilir (17).

Klinik: Nodal veya ektranodal yerleşimli olabilir (20,17). Diğer lenfoma tipleri ile karşılaştırıldığında ektranodal tutulum eğilimi fazladır ve %40'ın üzerinde saptanır (17,19). En sık ektranodal tutulum yeri gastrointestinal sistemdir (mide, ilioçekal bölge). Bunu; cilt, santral sinir sistemi, kemik, testis, yumuşak doku, tükrük bezi, kadın genital, akciğer ve böbrek takip eder. Hastalar tipik olarak hızlı büyüyen, sıklıkla semptomatik tek bir nodal ya da ektranodal tutulum ile gelir. Evreleme tetkiklerinde ise çoğunlukla hastalığın yaygın olduğu tespit edilmiştir (17). Erişkinlerin %40'ı tedaviye iyi cevap verir ve sağ kalım süresi uzundur. Geri kalanları hastalıktan dolayı kaybedilir (24).

İmmünofenotip: DBBHL'lar CD19, CD20, CD22 ve CD79a gibi değişik pan-B belirleyicilerini eksprese eder. Bununla birlikte bunların hepsini aynı anda eksprese etmeyebilirler (17).

Olguların %50-75'inde yüzey ve/veya sitoplazmik immünooglobulin (IgM>IgG>IgA) varlığı gösterilebilir. Sitoplazmik immünooglobulin (Ig) sıklıkla plazmositik ayrımlaşma gösteren tümörlerde saptanır (17).

CD5 ekspresyonu %10 olguda, CD10 ekspresyonu ise %25-50 olguda görülebilir. CD5(+) DBBH lenfomalar, küçük lenfositik lenfoma/kronik lenfositik lösemi'nin DBBHL'a progresyonundan çok de novo ortaya çıkar (17).

Hastaların yaklaşık %30-50'sinde bcl-2(+) iken büyük bir kısmında bcl-6(+)'dir. P53 protein ekspresyonu, plazma hücresine eşlik eden belirleyiciler olguların küçük bir kısmında gösterilebilir (17).

Anaplastik büyük B hücreli lenfomaların çoğu CD30 eksprese ederken, anaplastik olmayanlar nadiren eksprese eder (17).

Morfolojik varyantlar: Mikroskopik olarak dört morfolojik varyant belirlenmiştir. Bunlar sentroblastik, immünoblastik, T hücre/histositten zengin ve anaplastik varyantlardır (17).

-Sentroblastik varyant en sık görülen tiptir.

-İmmünoblastik varyant; immün aracılı hastalıklar (Haşimoto tiroiditi, Sjögren

sendromu, lupus eritematosus gibi), immünoproliferatif hastalıklar, immünoşüpresif durumlar ve immün yetmezlik durumlarında en sık görülen lenfoma tipidir. Çoğu çalışmada immünoblastik varyantın hafif de olsa daha kötü prognozlu olduğu bildirilse de diğer çalışmalarda bu doğrulanmamıştır (18, 25).

-T hücre/histiositten zengin tipte büyük B lenfositik tümör hücreleri, tüm hücre popülasyonunun %10'undan azını oluşturur (17). Büyük B hücreleri morfolojik olarak L-H hücreleri, sentroblast, immünoblast veya Reed Sternberg (RS) hücrelerine benzeyebilir (26). Zeminde neoplastik olmayan lenfositlerin hemen tamamı T hücreleridir. Özellikle nodüler büyüme paterni varsa ayırıcı tanıda başlıca Noduler Lenfosit Predominant Hodgkin Lenfoma (NLPHL) yer alır. Bu iki antite birçok fenotipik özellikleri paylaşırlar (27). T hücre/histiositten zengin tip DBBHL klinik olarak daha agresiftir, dendritik folliküler hücre için yapılan immünohistokimyasal boyamada farklı patern gösterir ve genomik hibridizasyonda da ikisinin farklılığı ortaya konmuştur (28, 29, 30).

-Anaplastik varyant nadir görülür. RS benzeri hücreler olabileceği gibi, koheziv patern yaparak karsinom benzeri görünüm de yapabilir ve sinüzoidal büyüme paterni gösterebilir (17). Ayırıcı tanıda T/null cell tip anaplastik büyük hücreli lenfomayı da düşünmek gereklidir (17).

DSÖ sınıflandırmasında ayrıca "full-length" anaplastik large cell lymphoma kinase (ALK) eksprese eden DBBHL tanımlanmıştır (31). Bu tipte immünoblastik hücreler, baskın olarak intravasküler büyüme paterni gösterir. Ayrıca bu olgularda sıklıkla yaygın nekroz ve ALK pozitifliği görülür (17).

Bunun yanı sıra DSÖ sınıflamasında spesifik olarak tanımlanmamış B hücre orijinli mikrovillus lenfomada elektronmikroskopik olarak hücrelerin yüzeyinde villuslar gösterilmiştir. Bunlar sinüs içinde yayılabileceği gibi lenf nodlarında diffüz yayılım da yapabilir (32).

Bir kısmı sitolojik, bir kısmı yapısal/topografik farklılıklar gösteren çok sayıda morfolojik değişiklikler tanımlanmış olmasına rağmen bu değişikliklerin prognoz veya tedavi şekline etkisi yoktur (17). Yanlış tanılardan kaçınmak için bu morfolojik değişikliklerin bilinmesi önemlidir (33). Örneğin tümörde belirgin sklerozis izlenebilir ve folliküler lenfoma benzeri görünüm ortaya çıkabilir (33). Yine rozet formasyonu özellikle FL'da bulunan bir özelliktir fakat DBBHL'larda da görülebilir. Taşlı yüzük görünümü en sık FL'da görülürken nadir de olsa DBBHL'larda da görülebilir ve ayırıcı tanıda metastatik adenokarsinomu düşündürür (34). Sinüzoidal büyüme paterninde

tümör hücreleri lenf nodu içinde diffüz yayılım yerine sadece sinüslerde sınırlı kalır. Metastatik adenokarsinom, malign melanom, anaplastik büyük hücreli lenfoma ile benzer görünümler ortaya çıkar. İnterfolliküler büyüme paterni en sık T hücreli tümörlerde görülmesine rağmen B hücreli neoplazmlarda da tanımlanmıştır (35). Yine nükleer multilobasyon T hücreli lenfomalara ait bir özellik olarak düşünülürken şu anda, B hücreli lenfomalarda daha sık görüldüğü bilinmektedir (36). İlginç bir fenotipik varyasyon da çok nadir saptanan keratin pozitifliğidir (37).

Genetik: DBBHL'da sıklıkla immünglobülin ağır ve hafif zincir genlerinde yeniden düzenlenmeler ve değişik bölgelerde somatik mutasyonlar bulunmuştur (17, 38).

Bcl-2 gen translokasyonu %20-30 olguda izlenirken, olguların %30'unda protoonkogen bcl-6'ı içeren 3q27 bölgesinin anormallikleri gözlenir (17). Myc yeniden düzenlenmesi çok sık değildir. Vakaların çoğunda kompleks sitogenetik anormallikler gözlenir (17).

DBBHL'larda Prognostic Faktörler

1-International Prognostik İndeks: DBBHL'ların prognozunu belirlemek için International Prognostic Factor Index (IPI) skorlaması kullanılmaktadır. Bu skortlama sistemi agresif lenfomaları kategorize etmek için geliştirilmiştir ve sağ kalımın bağımsız belirleyicileri olan, kolaylıkla elde edilebilen klinik göstergeler ile değerlendirilir (Tablo 2) (39). DBBHL'larda oldukça yararlı olan klinik prognostik belirleyicilerdir (39).

Tablo 2: IPI skorlaması

	Kötü prognoz
Yaş	>60
Ann-Arbor evresi	3 veya 4
LDH seviyesi *	>1
Ekstranodal bölgelerin sayısı	2 ya da >2
Performans durumu	ECOG PS ** 2 ya da >2

ECOG PS **: Eastern Cooperative Oncology Group Performans status,

LDH*: Laktat dehidrogenaz

Hastalar prognostik faktörlerin sayısına uygun olarak 4 risk grubuna ayrılır (Tablo 3) (39).

Tablo 3: IPI skorlamasına göre risk gruplarının sağkalım oranları

IPI	5 yıllık sağ kalım
Düşük risk:(0-1)	%73
Düşük-orta derecede risk(2)	%51
Orta-yüksek risk: (3)	%43
Yüksek risk: (4-5)	%26

IPI skorlaması aynı zamanda yavaş seyirli lenfomaların (FL, marjinal zon lenfoma, lenfoplazmositik lenfoma gibi), mantle hücreli lenfomaların ve T hücreli lenfomaların prognozlarını belirlemede de faydalıdır (40,41,42). Fakat özellikle yavaş seyirli NHL'larda çok yeterli sonuçlar vermediği için (FL'larda olduğu gibi) farklı prognostik faktörlerden oluşan skorlama sistemleri oluşturulmuştur (43).

DBBHL diğer lenfoma gruplarına göre klinik davranışları, histomorfolojik özellikleri, genetik anormallikleri, tedaviye cevapları ve prognozları farklılık gösteren heterojen yapıda bir tümördür (21). Normal hücrelerde çeşitli genetik ve epigenetik değişikliklerin üst üste eklenmesiyle malign bir hücre klonu ortaya çıkar. Bu gelişen tümör hücrelerinin fenotipik özellikleri tümörün agresif davranışını, ikiye katlanma kapasitesini, apoptozdan kaçabilmesini, çoğalmasını durdurucu sinyallere cevap vermemesini, yayılma kapasitesini ve angiogenezisi uyarımını belirler (44).

2-Prognozu etkileyen genetik faktörler: IPI skorlamasına göre aynı prognostik gruba giren hastalarda çok farklı klinik sonuçlar alınabilir. Bilindiği gibi IPI klinik göstergeler ışığında prognoz hakkında fikir vermektedir. Fakat tümör hücrelerindeki moleküler düzeydeki anormallikleri dikkate almaz. Aynı IPI skoruna sahip hastalar arasındaki davranış farklılıklarını açıklamak için moleküler düzeydeki anormallikleri tanımlayabilmek faydalı olabilir (45). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki genetik ve moleküler heterojenite, hastalığın agresifliğinde ve tümör progresyonunda etkilidir. Ayrıca moleküler ve genetik belirleyiciler hastalığın sağ kalımını belirlemede de değerlidir (21).

3q27 translokasyonu DBBHL'larda en sık saptanan translokasyondur (46). Bu translokasyon sonucunda bcl-6 protoonkogeninde yeniden düzenlenmeler ortaya çıkmaktadır. Bcl-6 mutasyonlarının iyi klinik gidiş gösterdiğini bildiren çalışmalar vardır. O(6)-metilguanin-DNA-metil transferaz (MGMT) gen hipermetilasyonu, hastalısız sağkalım ve toplam sağkalımda daha iyi sonuç ile koreledir (47).

Bir tümör supresör geni olan TP53 mutasyonu olguların %18-30'unda saptanmıştır ve bu mutasyon kısa sağ kalım süresi ve kısa hastalısız yaşam süresi ile birliktelik göstermektedir (48). Siklin bağımlı kinaz inhibitör proteini olan p27 KIP1'in artmış ekspresyonunun DBBHL'larda kısa sağ kalım süresi ve kısa hastalısız yaşam süresi ile birliktedir (49). Hücrelerin G1 fazından S fazına geçmesinde rol oynayan cyclin D3'ün tümörde artmış ekspresyonu düşük komplet remisyon hızı ve 3 yıldan kısa yaşam süresi ile birliktedir (21). REL protoonkogen amplifikasyonu ektranodal bölgelerde gelişen DBBHL ile ilişkilidir (50). c-MYC gen yeniden düzenlenmeleri başlıca ektranodal DBBHL veya FL'dan transforme DBBHL ile ilişkilidir (51). MUC1 deregülasyonunun tümör progresyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (52). DBBHL'ların %47-58'inde bcl-2 protein ekspresyonu tanımlanmıştır ve artmış bcl-2 ekspresyonu kısa hastalısız yaşam süresi ve düşük sağkalım ile birlikte olduğu bildirilmektedir (53).

3-DBBHL'ların immüfenotipik ve genotipik alttipleri: Son yıllarda cDNA microarray kullanılarak yapılan gen ekspresyon çalışmalarında DBBHL'ların heterojenitesi gösterilmiş, GMK, NGMK ve tip 3 olarak prognostik alt gruplar tanımlanmıştır (45).

Çoğu çalışmada GMK gen ekspresyon profiline sahip hastaların prognozunun, NGMK gen ekspresyonu profiline sahip hastalardan çok daha iyi prognozlu olduğu saptanmıştır (45). Fakat teknolojik olarak pahalı ve zahmetli olan bu yöntem yerine daha basit, ucuz ve geniş uygulama alanına sahip olan immünhistokimyasal yöntemler kullanılarak da DBBHL'ların GMK ve NGMK olarak alttiplere ayrılabilceği anlaşılmıştır. Buna göre CD10 ve/veya bcl-6 (+), MUM-1 (-) olgular GMK kabul edilirken, MUM-1 (+) olgular NGMK olarak kabul edilmektedir (54).

Çalışmamızda kullandığımız immünohistokimyasal belirleyiciler;

CD10: membranla ilişkili nötral endopeptidazdır (55). DBBHL'larda %20-30 oranında saptanır (56). İlk olarak pro B hücrelerinde görülür ve antijen ile karşılaşmamış B hücreye matürasyon aşamasında kaybolur (57). Antijen bağımlı germinal merkez B hücre maturasyonunda hücre yüzeyinde tekrar ortaya çıkar. Orijini germinal merkez olan hücreler için çok sensitif olmamakla beraber oldukça spesifik bir belirteçtir ve iyi prognoz göstergesidir (58). CD10 ve bcl-6 germinal merkez B hücreleri için bilinen en iyi belirleyicilerdir (59).

Bcl-6: Bcl, sekans spesifik transkripsiyonel reseptörüdür ve bcl-6 germinal merkez formasyonu için gereklidir (21). Sadece matür germinal merkez B hücrelerinde (sentroblast ve sentrositler) ve germinal merkez ayrılaşma evresindeki hücrelerden kaynaklanan lenfomalarda eksprese edilir. Bcl-6 yeniden düzenlenmeleri DBBHL'ların %35'inde ve FL'ların küçük bir kısmında tespit edilirken NHL'ların diğer tiplerinde veya diğer lenfoid neoplazmlarda bulunmaz (60).

MUM-1: Multiple myelom 1 (MUM-1) geni, interferon regülatör faktör gen ailesinin üyesi olan bir protoonkogendir. Altıncı kromozomda bulunan MUM-1 geni, Multiple myeloma'lı hastalarda t(6,14)(p25;q32) translokasyonu sonucu 14. kromozomda bulunan Ig H lokusu yanına taşınır (61).

Biyolojik fonksiyonu net olarak bilinmese de lenfoid hücrelerde transkripsiyonun düzenlenmesinde rol oynar. Farelerde MUM-1 ekspresyonu sonucu B ve T hücrelerinin fonksiyonunda bozulma, B hücrelerinde aktivasyon kaybı, plazma hücrelerinin kaybı ve bunun sonucunda serum immünooglobulininde belirgin azalma olduğu görülmüştür (61).

Çoğu hematolenfoid tümörde (multiple myeloma, kronik lenfositik lösemi/küçük lenfositik lenfoma, lenfoplazmositik lenfoma, DBBHL) ve malign melanom da MUM-1' in artmış ekspresyonu saptanmıştır. Bunların dışında hiçbir tümörde saptanmamıştır (61). DBBHL'da cDNA mikroarray kullanılarak gen ekspresyon profili araştırılan bir çalışmada, MUM-1'in NGMK fenotipi belirlemede önemli bir belirleyici olduğu saptanmıştır (45).

Bcl-2: Dış mitokondrial membranın, nükleer membranın ve endoplazmik retikulumun sitoplazmik yüzünde bulunan integral membran proteindir. Normal lenfositik hücrelerde pre-B evresinde eksprese edilir ve farklılaşma ilerledikçe ekspresyon dereceli olarak azalır (62).

Bcl-2 ailesi; toplam 15 üyeden oluşan üç gruptan oluşmaktadır.

1-Bcl-2 subfamily (pro-survival): Bcl-2, Bcl-x, Bcl-w, Mcl-1, A1

2-Bax subfamily (Pro-apoptotik): Bax, Bak, Bok

3-BH3 subfamily (pro-apoptotik): Bad, Bid, Bik, Blk, Hrk, BNIP3, BimL

Bcl-2, t(14;18)(q32;q21) translokasyonunda yer alması ile keşfedilmiştir. Bu translokasyon sonucu 18.kromozomdaki bcl-2 geni 14.kromozomdaki immünglobülin loküsünün ağır zincir bölgesine taşınır. Bu da bcl-2'nin artmış ekspresyonuna ve apoptozise karşı hücrel dirence yol açar (63). Bu translokasyon foliküler lenfomaların %70-85'inde, DBBHL'in yaklaşık %20-30'unda bulunur (64).

Hücreler stresle karşı karşıya kalınca bcl-2 ve bcl-x mitokondrial membranda kaybolur ve yerlerine proapoptotik üyeler gelir (Bak, Bax vb). Bcl-2 ve bcl-x seviyeleri düştüğünde mitokondrial membranın geçirgenliği artar. Kaspaz kaskadını aktive edecek birçok protein serbest kalır. Bu proteinlerden bir tanesi de sitokrom c'dir. Sitokrom c, Apaf-1 (apoptosis activating factor) adlı proteine bağlanır ve kompleks kaspaz 9'u aktive eder (38).

Bcl-2 doğrudan veya dolaylı olarak mitokondriden sitokrom c'nin salınımı baskılayarak mitokondrial hasarı önler ve hücrenin ölümden korunmasını sağlar. Hücrede bcl-2 ve bcl-x'in kaybolması sitokrom c'nin serbest kalmasına, Apaf-1'in aktivasyonuna izin verir. Aynı zamanda bcl-2 ve bcl x, direkt olarak Apaf-1'e bağlanarak da, Apaf-1'in aktivasyonunu inhibe edebilirler (65).

DBBHL'larda bcl-2 proteini overekspresyonu aynı zamanda 18q amplifikasyonu ile de olabilir (66). Foliküler lenfoma ve DBBHL'larda bcl-2 geninin açık okunan genin regülatuar elemanlarının bulunduğu parçasında, nokta mutasyonları da tespit edilmiştir (67). Bu nokta mutasyonları veya posttranslasyonel değişiklikler, t(14;18) translokasyonu veya bcl-2 gen amplifikasyonu olmayan hastalarda bcl-2 overekspresyonunun sebebi olabilir (67).

Ki-67: Ki-67 proteini, ilk olarak 1983 yılında prototip monoklonal antikor Ki-67 ile tanımlandı (68). 1993 yılında Ki-67 antijeninin, tek bir gen tarafından transkripte edilmiş mRNA prekürsörünün alternatif splicing'i ile elde edilmiş 320 kD ve 359 kD moleküler ağırlığa sahip 2 protein izoformu tanımlanmıştır (68).

Ki-67 antikoru sadece çoğalan hücrelerin (normal hücreler ve tümör hücreleri) nükleuslarında reaktiftir. Çünkü Ki-67 antijeni G1, S, G2 ve mitoz fazındaki hücrelerin

nükleuslarında bulunurken, dinlenme fazındaki (G0) hücrelerde eksprese edilmez. Bununla birlikte Ki-67 antijeninin G1 fazı boyunca relatif ekspresyonuyla ilgili tartışmalar mevcuttur (68).

Her ne kadar Ki-67 proteininin çoğalan hücrelerde nasıl bir fonksiyonel rolü olduğu tam olarak bilinmese de; Ki-67 protein ekspresyonu ve hücre çoğalması arasındaki sıkı ilişki inkar edilememektedir. Yüksek proliferasyon özelliği Ki-67 pozitifliği ile gösterilmiş olan agresif lenfomalarda, Ki-67 artışının düşük sağkalım süresi ile ilişkili olduğunu bildiren çok sayıda çalışma vardır. Bununla birlikte bazı çalışmalarda IPI'e prognostik bilgi sağlamadığı gösterilmiştir (69). Düşük Ki-67 indeksi olan tümörler, malign hücrelerin çoğunluğunun G0/G1 fazında olmaları nedeniyle siklik-spesifik sitotoksik kemoterapiye rezistans gösterebilir (21).

Siklooksijenaz (COX): Araşidonik asitten prostoglandin (PG) oluşumunda rol oynayan bir enzimdir (53,70). Prostoglandinler, araşidonik asit metabolitidir ve tüm memeli dokularında üretilir. Vazokonstriksiyon, vazodilatasyon, trombosit agregasyon aktivasyonu ya da inhibisyonu ve immünomodulasyon gibi değişik biyolojik aktiviteleri vardır (71). Bunlar malign tümörlerin gelişimi ve büyümesinde de etkilidir. Ayrıca tümör ve normal dokuda sitotoksik ajanlara cevapta rol alırlar (71). Siklooksijenaz enziminin iki izoformu vardır.

1- COX-1; değişik fizyolojik fonksiyonlarda, homeostaziste rol oynar ve çoğu dokuda eksprese edilir.

2- COX-2; normalde dokuda saptanmaz veya düşük seviyede bulunur. COX-2 geni, hızlı erken yanıt genidir. Mitojenik yada inflamatuvar uyarılar (tümör promoterleri, sitokinler, endotoksinler ve büyüme faktörleri) COX-2 sentezine yol açar (72). Ayrıca COX-2 ekspresyonu onkogenler ve p53 tarafından da regüle edilir. Bu da p53 mutasyonu gösteren bazı tümörlerde artmış COX-2 ekspresyonunun nedenini açıklayabilir (70).

COX-2 bir çok inflamatuvar durumda, organ gelişiminde ve tümör biyolojisinde rol oynar (70). COX-2 enzimi, araşidonik asitten PGG₂ sentezini ve daha sonrasında da PGH₂ sentezini katalizler, PGH₂ ise diğer prostanoidler için prekürsördür (71).

In vitro veriler, prelinik hayvan deneyleri, klinik insan deneyleri ve epidemiyolojik çalışmalar ile prostoglandinlerin karsinogenezdeki rolü ispatlanmıştır (70). Prostoglandin E₂'nin, B lenfositlerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynadığı ve lenfomalı hastalarda PG E₂ seviyesinin yüksek olduğu bulunmuştur (70). PGE₂'nin insan kolon kanser hücrelerinde apoptozisi inhibe etmesi ve bcl-2

ekspresyonunu arttırması yanısıra, PGE2 ve PGI2' i de içeren birkaç türünün rat hepatositlerinde hücre proliferasyonunu ve DNA sentezini arttırdığı bulunmuştur (73). Prostaglandinler ayrıca vascular endothelial growth factor (VEGF) ekspresyonunu da regüle eder (74).

Bugüne kadar COX-2'nin tümörigenezde oynadığı rol ile ilişkili en az 5 mekanizma tanımlanmıştır (71):

- 1- apopitozun inhibisyonu;
- 2- artmış anjiogenezis;
- 3-artmış invazyon kapasitesi;
- 4- inflamasyon/immünsüpresyon'un modülasyonu;
- 5- prokarsinojenlerin karsinojene dönüşümü.

1-COX-2 ve apopitozis: Çok sayıdaki çalışmada COX-2 ekspresyonu ve apopitozis inhibisyonu arasındaki pozitif korelasyon açıkça gösterilmiştir (71). Çalışmalarda COX-2'nin artmış ekspresyonunun apopitoza dirence neden olarak tümörigenezis potansiyelinde artışa da yol açtığı ispatlanmıştır (70). COX-2'nin selektif inhibitörlerinin, çeşitli tümörlerde (kolon tümörlerinde, mide tümörleri, prostat karsinomları) apopitozisi uyardıkları gösterilmiştir (70).

COX-2'nin anti-apopitotik aktivitesinin mekanizması tam aydınlatılamamış olsa da; azalmış seramid üretimi, artmış bcl 2 ekspresyonu, antiapopitotik Akt-kinaz'ın upregülasyonu öne sürülen mekanizmalardandır (70).

2-COX-2 ve anjiogenezis: Solid tümörlerin büyümesi ve metastazı yeni damar oluşumuna bağlıdır. Tümör hücreleri; VEGF ve fibroblast growth faktör (FGF) gibi çeşitli faktörler sekrete ederek anjiogenezis uyarır ve tümörün büyümesini sağlar. VEGF tümör anjiogenezinde en önemli faktördür. Son çalışmalar COX-2 metabolik ürünlerinin, tromboksan A2 gibi, neovaskülarizasyona yol açarak solid tümörlerin büyümesi ve metastazına destek olduğunu göstermektedir (71). COX-2 proanjiogenik maddelerin salınımında ve aktivitesinde rol oynayarak anjiogenezise etki eder (75).

Akciğer ve mide karsinomlu olgularda COX-2 ekspresyonu ile anjiogenezis arasındaki korelasyon gösterilmiştir (74). COX-2'nin anjiogenik etkilerine ikincil olarak COX-2'nin miktarı ile tümör boyutu ve alttaki dokulara invazyonu arasında da bir korelasyon vardır (76). Çok sayıdaki çalışmada selektif COX-2 inhibitörlerinin FGF ve VEGF mRNA seviyelerini düşürerek, antianjiogenik etki gösterdiğini bildirmektedir (71).

3-COX-2 ve invazyon: Solid tümörlerin progresyonunda önemli olan transforme hücrelerin lokal veya uzak bölgelere yayılımıdır. Çoğu çalışmada kanser hücrelerinin invaziv özelliğinin düzenlenmesinde COX-2'nin önemli rolü olduğunu vurgulanmaktadır. Artmış invazyon kapasitesine, matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) aktivasyonu ve MMP-1'in artmış mRNA ekspresyonu eşlik eder. MMP'lar degradatif enzim ailesine üyedir. Bunların ekspresyonu, tümör hücrelerinin bazal membrana invazyonu, stromaya ve kan damarlarına penetrasyonu ve tümör hücrelerinin metastazı ile ilişkilidir. COX-2'nin MMP'ların üretimi ve sekresyonunda rol aldığı düşünülmektedir (71).

COX-2 ayrıca tümör hücresi adezyonunda da etkilidir. Rat intestinal epitelyum hücrelerinde COX-2'nin artmış ekspresyonunun ekstrasellüler proteinler olan laminin ve matrigel'e adezyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bu biokimyasal değişiklikler metalloproteinaz-2'nin artmış ekspresyon ve aktivasyonu yanı sıra, azalmış E-cadherin ekspresyonu ile de ilişkilidir (77).

Kolon kanserlerinde COX-2 ekspresyonunun artmış metastatik potansiyel ile birliktelik gösterdiği saptanmıştır. Fakat altta yatan mekanizma net anlaşılamamıştır (78). Gastrik karsinomlarda, COX-2 ekspresyonunun yoğunluğu ile lenf nodu yayılımı ve küçük damar yoğunluğu arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (74).

4-COX-2 ve inflamasyon-immünsüpresyon: Kronik enflamasyon epitelyal karsinogenezis için tanımlanmış bir risk faktörüdür. İnflamasyonda sitokinler COX-2'yi uyarır ve buna bağlı artmış PG sentezi ortaya çıkar. Tümörün büyümesine tipik olarak immünsüpresyon eşlik eder. Tümör hücrelerinden salınan "colony stimulating" faktörler monosit ve makrofajları aktive ederek PGE2 sentezini uyarırlar. PGE2; lenfokinlerin, T ve B hücre proliferasyonunu ve natural killer hücrelerinin sitotoksik aktivitesini baskılar. PGE2 aynı zamanda tümör nekrozis faktör üretimini de baskımlarken immünsüpresif etkiye sahip IL-10 üretimini artırır (71).

5-COX-2 ve prokarsinojen/karsinojen: COX-2 enziminin peroksidaz aktivitesi prokarsinojenlerin karsinojenlere dönüşümünü katalizlediği için oldukça önemlidir. COX-2 nin peroksidaz aktivitesi ile önemli oranda ksenobiotikler, mutajenlere co-oksidize olabilir. Ksenobiotik maruziyeti nedeniyle bu özellikle kolonda belirgindir (71).

Çoğu solid tümörde COX-2 ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğunu bildiren çok sayıda yayın bulunmasına rağmen lenfomalarda COX-2 ekspresyonu ve bunların prognoza etkilerini araştıran az sayıda yayın bulunmaktadır (71).

Survivin: Apoptoz inhibitör protein (AİP) ailesinin üyesi olup, 16,5 kDa'luk intraselüler bir proteindir. Hücre bölünmesi ve apoptozun düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Embriyonik dönemde ve tümörlerin çoğunda eksprese edilirken, normal diferansiye hücrelerde bulunmaz (79).

Survivin'in; survivin, survivin-delta Ex3 ve survivin 2B gibi çok sayıda varyantı vardır. Survivin ve survivin-delta Ex3, anti-apoptotik özelliktedir. Survivin 2B ise anti-apoptotik survivin varyantlarının doğal antagonistidir (79).

Apoptoza artmış direnç transforme hücrelerin ölümden korunmak için en etkili yöntemidir. Kaspaz kaskadı bir proteaz zinciridir. Kanser direncinin diğer bir potansiyel kaynağıdır. Bu nedenle kaspaz inhibitörü olan "inhibitor of apoptosis protein ailesi" (İAP) onkogeneziste rol oynayabilir (80). Kanserin İAP içermesinin en önemli delili survivin'in bulunmasıdır. Survivin; DLBCL'in sonucuna etki eden bağımsız prognostik faktör olarak tanımlanmıştır (80).

Apoptoz; intrensek (mitokondrial) yol ya da ekstrinsek yolla oluşabilir. Ekstrinsek yolda kaspaz 8 görev alırken, intrensek yolda kaspaz 9 görev alır (81).

Başlangıçta survivin'in direk olarak kaspaz 3'ün aktivasyonunu baskıladığı düşünülmüştür. Daha sonra yapılan araştırmalarda survivin'in böyle bir etkisi olmadığı anlaşılmıştır (82). Bazı araştırmacılar ise survivin'in diğer apoptoz inhibitör proteinleri gibi apoptozu başlatan kaspaz 9'a bağlanarak ve/veya yeni İAP-inhibitör protein olan SMAC/DIABLO'yu nötralize ederek indirek etkili olabileceğini bildirmektedirler (82).

Transkripsiyonel faktörler; örneğin p53, değişik kanserlerde survivin ekspresyonunu regüle edebilir. Mide ve pankreas kanseri, prostat, akciğer ve epidermoid kanser gibi çoğu kanserde p53 akümüülasyonu ile survivin ekspresyonu arasında korelasyon gösterilmiştir. Aynı zamanda survivin; mdm2 ve proteozomların regülasyonu ile p53'ün aktivitesini etkileyebilir (79).

Çoğu çalışmada survivin eksprese eden hücrelerin, apoptozu uyaran antikanser ilaçlara dirençli olduğu gösterilmiştir. Survivin'in artmış ekspresyonunda kemoterapi ve radyoterapiye rezistans, dolayısıyla tümör rekürrens hızında artış ve kısa sağkalım ile birliktelik saptanmıştır. Yapılan çoğu çalışmada tümörler için kötü prognostik bir gösterge olduğu bildirilmektedir (79).

Survivin anti-apoptotik etkisine ek olarak hücre bölünmesini de düzenleyebilir. Çünkü son çalışmalarda survivin'in mitotik iğlerde lokalize olduğunu gösterilmiştir. Mitoz esnasında survivin, karboksil uçlu alfa sarmalları ile mitotik iğ için mikrotübüllerine

bağlanır ve hücre bölünmesi sırasında kromozomların doğru ayrılabilmesine yardım eder (79). Hücre siklusunda G2/M fazında eksprese edilir ve hızlı hücre bölünme mekanizmasına destek olur. Kanser hücrelerinde atılmış survivin ekspresyonu, hücre siklus kontrol noktalarını bozarak artmış hücre proliferasyonuna neden olabilir (79).

GEREÇ VE YÖNTEM:

Bu çalışmada 1990-2006 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında DBBHL tanısı almış 100 olgu incelenmiş ve bunlardan klinik takibi bulunan 50 hasta çalışma kapsamına alınmıştır. Hastaların yaşı, cinsiyeti ve tümör lokalizasyonu patoloji rapor kayıtlarından elde edilmiştir. Hasta sağkalım verilerine klinik verilerden ulaşılmıştır.

Tüm olgulara ait Hematoksilen Eozin boyalı arşiv preparatları tekrar değerlendirilmiştir. Olgulara ait tümörü temsil eden uygun parafin bloklar seçilmiş ve gerek morfolojik, gerekse immünohistokimyasal yöntemle CD3 ve CD20 antikorları uygulanarak DBBHL tanıları tekrar doğrulanmıştır.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ:

İstatistiksel işlemler, SPSS-11 (Scientific Package for Social Sciences) for Windows programı kullanılarak yapılmıştır.

Tüm hastaların tanımlayıcı özelliklerine ilişkin yüzde değerleri alınmıştır. Yaş, sağkalım sürelerinin ortalamaları ile birlikte standart hataları hesaplanmıştır. Sağkalımı etkilediği düşünülen tüm bağımsız değişkenlerin Kaplan-Meier Sağkalım eğrileri hazırlanmıştır.

Değişkenlerin sağkalım üzerine etkisini değerlendirmede tekli analiz olarak Log Rank Analizi, çoklu analiz olarak Cox Regresyon Analizi kullanılmıştır.

DBBHL atlitpleri arasında survivin, COX-2, bcl-2, Ki-67 ve CD3 ekspresyonları açısından anlamlı fark olup olmadığı Çok Gözlü Düzenlerde Ki-Kare Analizi ile belirlenmiştir. 0,05'ten küçük olasılık katsayıları istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA:

İmmünohistokimyasal boyalar için lizinli lamlara 5 mikronluk kesitler hazırlanmıştır. Tüm olgulara aşağıdaki antikorlar ile İHK'sal boyama yapıldı.

Antikorlar: CD3 (RM-9107-R7, Neomarker), dilüsyon: 1/100
CD20 (MS-340-R7, Neomarker), predilüe
CD10 (MS-728-R7, Neomarker), dilüsyon: 1/40
bcl-6 (M7211, DakoCytomation), dilüsyon: 1/20
MUM-1 (M7259, DakoCytomation), dilüsyon: 1/50
bcl-2 (M-0887, DakoCytomation), dilüsyon: 1/100
Ki-67 (RM-9106-S, Neomarker), dilüsyon: 1/100
COX-2 (RB-9072-P1, Labvision), dilüsyon: 1/200
Survivin (RB-1629-P1, Labvision), dilüsyon: 1/100

Hazırlanan kesitler 20 dakika ksilolde bekletilerek deparafinize edildi ve inen alkol serilerinden (%96, %90, %80, %70) geçirilerek rehidrate edildi. Daha sonra %3'lük H₂O₂'de 15 dakika uygulanarak endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. CD20 antikoruna için kaynatma yapılmadan antikorlar uygulandı. CD3, CD10, MUM-1, COX-2 ve survivin antikoruna uygulananlar sitrat buffer solusyonunda (0,01ml/l, pH=6) mikrodalga fırında 3 kez 5'er dakika kaynatılarak antijenin açığa çıkması sağlandı. Kesitler bcl-2 için; pH=9 EDTA Buffer solüsyonunda 20 dakika kaynatılırken, pH =8 EDTA Buffer solusyonunda Ki-67 25 dakika, bcl-6 36 dakika, CD 10 ise 30 dakika kaynatıldı. Kesitler 15-20 dakika süreyle oda ısısında soğumaya bırakıldı. Daha sonra aşağıdaki basamaklardan geçildi.

- 1) Kesitlere CD3, CD20, bcl-6, CD10, MUM-1, bcl-2, Ki-67, COX-2 ve Survivin primer antikorları damlatılarak oda ısısında 1 saat bekletildi.
- 2) Tris solusyonunda (PH=7,2) 5 dakika yıkandı.
- 3) Biotinize antikordan damlatıldı ve 15 dakika bekletildi.
- 4) Tris solusyonu ile 5 dakika yıkandı.
- 5) Streptavidin peroksidaz solüsyonu damlatılarak 15 dakika bekletildi.
- 6) Tris solüsyonunda 5 dakika yıkandı.
- 7) Kromojen olarak 3,3-diaminobenzidintetraklorür (DAKO, Denmark) solüsyonundan kesitler üzerine damlatılarak 7 dakika bekletildi ve daha sonra akan suda 5 dakika yıkandı.
- 8) Tüm kesitler zıt boyama sağlamak için Mayer'in hematoksilen boyasında 2 dakika süreyle bekletildi.
- 9) Tekrar akan suda yıkandıktan sonra yükselen alkol serilerinden (%80, %90, %96, izopropil alkol, izopropil alkol+ksilol) geçirilerek ksilolde 20 dakika bekletildi.
- 10) Entellan (Merck) damlatılarak lamelle kapatıldı.

İMMÜN REAKTİVİTENİN DEĞERLENDİRİLMESİ

CD20 primer antikoru için pozitif kontrol olarak tonsil dokusu kullanıldı. Tümör hücrelerinde membranöz boyanan hücre oranı (>%20) değerlendirildi (Resim 1).

CD3 primer antikoru için de pozitif kontrol olarak tonsil dokusu kullanıldı. Tümör hücrelerinde membran boyanması değerlendirildi (Resim 2). Boyanma yoğunluğuna göre 4 grup belirlendi. Hiç boyanma izlenmeyen grup:0 olarak kabul edilirken, tümör hücreleri arasında tek tek dağılmış pozitif hücre varsa grup:1, pozitif hücreler 10-15'li topluluklar oluşturmuş ise grup: 2 eğer topluluklar 15'ten fazla pozitif hücre içeriyorsa grup:3 olarak kabul edildi.

CD10 primer antikoru için pozitif kontrol olarak böbrek dokusu kullanıldı ve tümör hücrelerinde sitoplazmik boyanma değerlendirildi (Resim 3). Tümörde 10 büyük büyütme alanı (BBA) tarandı. Bu alanlarda tümör hücrelerinde %20'nin altında boyanma varsa negatif ve %20'nin üzerinde boyanma varsa pozitif olarak kabul edildi (59).

Bcl-6 primer antikoru için pozitif kontrol olarak tonsil dokusu kullanıldı. Tümör hücrelerinin nükleer boyanması değerlendirildi (Resim 4). 10 BBA taranarak tümörde %20'nin altında boyanma varsa ekspresyon negatif, %20'nin üzerinde boyanma varsa ekspresyon pozitif olarak kabul edildi (59).

MUM-1 primer antikoru için pozitif kontrol olarak tonsil dokusu kullanıldı. Tümör hücrelerinin nükleer ve sitoplazmik boyanması değerlendirildi (Resim 5). Tümörde 10 BBA tarandı ve %20'nin altındaki ekspresyonlar negatif, %20'nin üzerindeki ekspresyonlar pozitif olarak kabul edildi (59).

Bcl-2 primer antikoru için pozitif kontrol olarak tonsil dokusu kullanıldı. Tümör hücrelerinde sitoplazmik boyanma değerlendirildi (Resim 6). Tümörde 10 BBA taranarak tümör hücrelerinin %30'unun üzerinde boyanma pozitif, %30'unun altı boyanma negatif olarak kabul edildi (83).

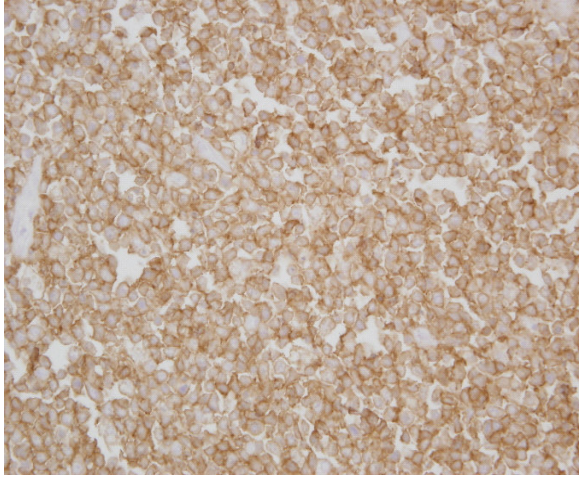
Survivin primer antikoru için pozitif kontrol olarak mide mukozası kullanıldı. Tümör hücrelerinde nükleer boyanma değerlendirildi (Resim 7). Tümörde 10 BBA tarandı ve tümör hücrelerinin %30'unun üzerinde boyanma pozitif, %30'unun altı boyanma negatif olarak kabul edildi (83).

COX-2 primer antikoru için pozitif kontrol olarak kolon adenokarsinomlu doku örneği kullanıldı. Tümör hücrelerinde sitoplazmik ve membranöz boyanma değerlendirildi (Resim 8). Boyanan tümör hücrelerinin oranına göre sıfırdan ikiye kadar olan bir skala oluşturuldu. Tümör hücrelerinin %10'unun altında boyanma;0,

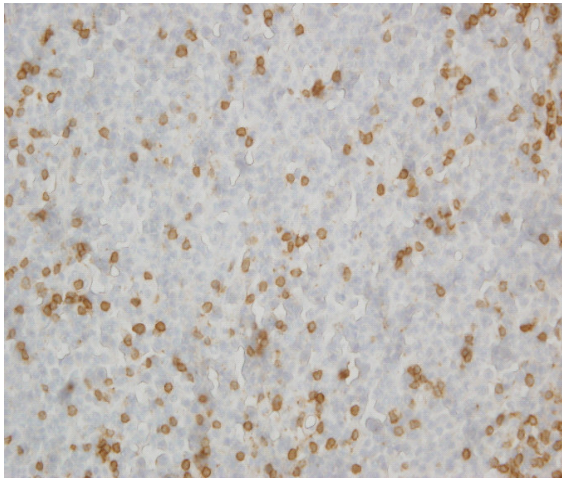
%10-50 arası boyanma:1 ve %50'nin üzerinde boyanma gösterenler ise:2 olmak üzere üç grup oluşturuldu.

Ki-67 primer antikorunu için pozitif kontrol olarak tonsil dokusu kullanıldı. Tümör hücrelerinde nükleer boyanma değerlendirildi (Resim9). Kareli oküler ile 500 hücre sayılarak olumlu boyanan hücrelerin toplam hücrelere oranı hesaplandı. Daha sonra hesaplanan oranları %0-49 arasında olanlar;0, %50-79 arasında olanlar;1 ve %80-100 arasında olanlar;2 olacak şekilde üç grup belirlendi (84).

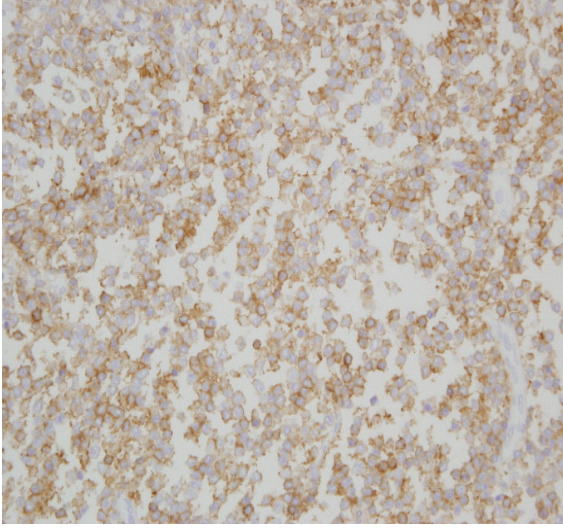
Resim 1. DBBHL'larda CD20 ile sitoplazmik membran immünoreaktivitesi (x400)



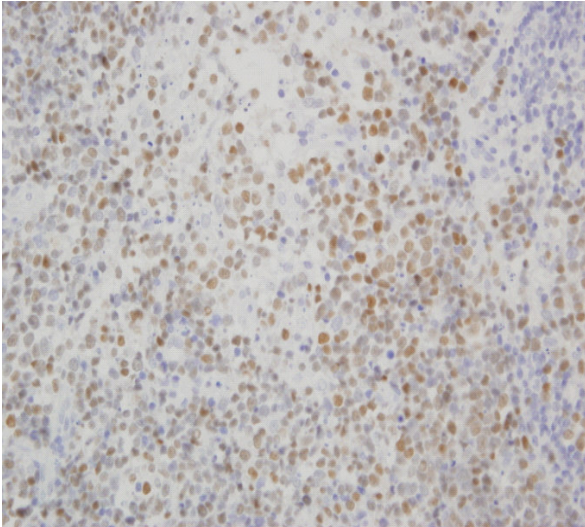
Resim 2. DBBHL'larda CD3 ile hücre membran immünoreaktivitesi (x400)



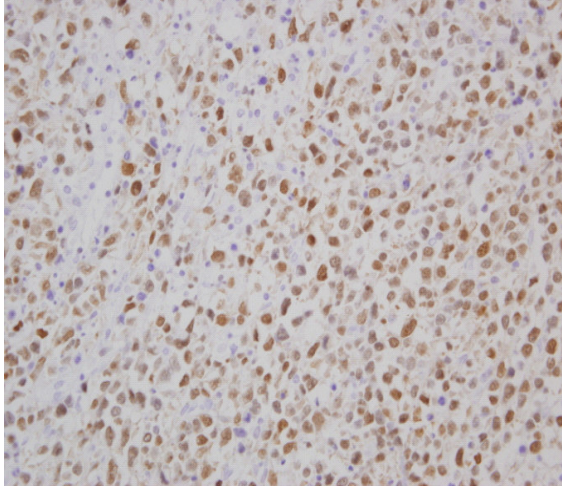
Resim 3. DBBHL'larda membranöz CD10 immünoreaktivitesi. (x400)



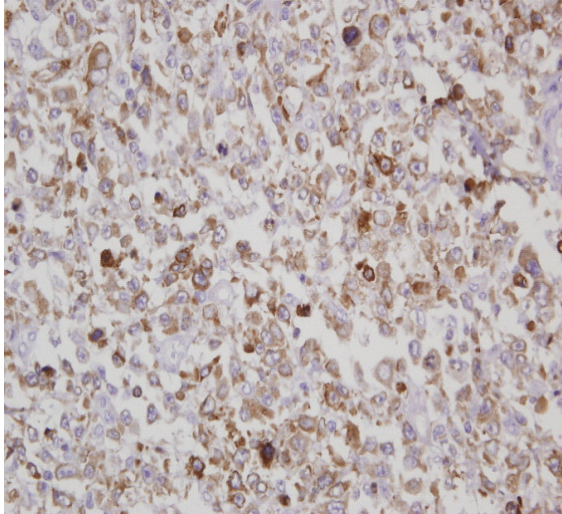
Resim 4. DBBHL'larda nükleer bcl-6 immünoreaktivitesi (x400)



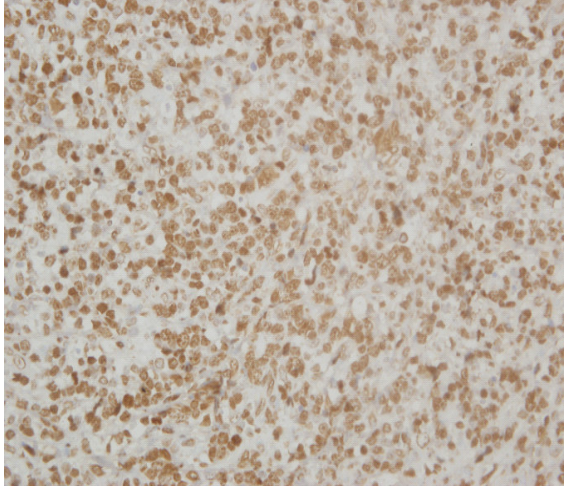
Resim 5. DBBHL'larda nükleer ve sitoplazmik MUM-1 immünoreaktivitesi (X400)



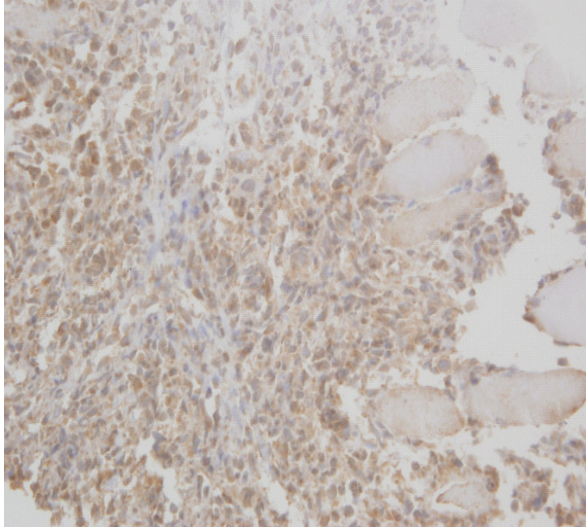
Resim 6. DBBHL'larda sitoplazmik bcl-2 immmoreaktivitesi (X400)



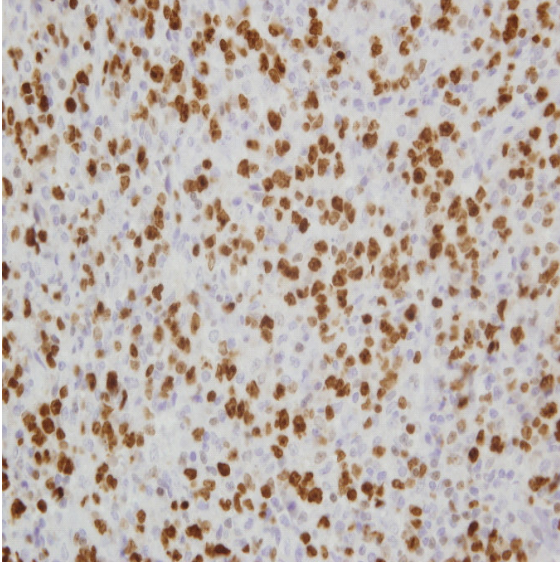
Resim 7. DBBHL'larda nükleer survivin
İmmünoreaktivitesi(X400)



Resim 8. DBBHL'larda sitoplazmik ve membranöz COX-2
immünoreaktivitesi (x400)



Resim 9. DBBHL'larda nükleer Ki-67
immünoreaktivitesi (x400)



BULGULAR:

50 hastanın 23'ü kadın (%46), 27'si (%54) erkektir. Genel yaş ortalaması 57.6 ± 2.3 (17-95)' dir. Hastaların ortalama sağkalım süreleri 44.4 ± 5.5 (3-160) aydır. Yaşayan olguların ortalama takip süresi 52 aydır (median:39 ay, aralık:10-160 ay).

DSÖ'nün kabul ettiği yaşlılık yaşı olan 65 yaş altı ve üstüne göre hastalar gruplandırılmıştır. Buna göre 65 yaş altında 32 hasta (%64), 65 yaş ve üstünde 18 hasta (%36) bulunmaktadır. 10 lu yaş gruplarına göre değerlendirildiğinde hastaların 45-54 yaş aralığında (16 kişi, %32) daha fazla olduğu görülmüştür.

50 hastanın 16'sı GMK (%32), 26'sı NGMK (%52) ve 8'i ise sınıflandırılmayan (%16) grupta yer aldı.

Bcl-2 %30 ve altında olan hasta sayısı 31 (%62), %30 üzeri olan hasta sayısı 19 (%38) idi.

CD3 ile pozitiflik saptanmayan 5 hasta (% 10), tek tek dağılmış pozitif hücreler içeren 16 hasta (%32), 10-15 pozitif hücre içeren topluluklar yapmış 13 hasta (%26), 15 ten fazla sayıda pozitif hücre içeren topluluklar yapmış 16 hasta (%32) saptandı.

COX-2 ile <%10 pozitiflik 20 hastada (%40), %10-50 pozitiflik 15 hastada (%30), >%50 pozitiflik 15 hastada (%30) saptandı.

Survivin ile <%30 pozitif hasta sayısı 26 (%52) iken, %30 ve üzeri pozitif hasta sayısı 24 (%48) idi.

Ki-67 ile %0-49 oranında boyanma gösteren 32 hasta (%64), %50-79 oranında boyanma gösteren 14 hasta (%28) ve %80-100 boyanma gösteren 4 hasta (%8) olduğu saptandı (Tablo 4).

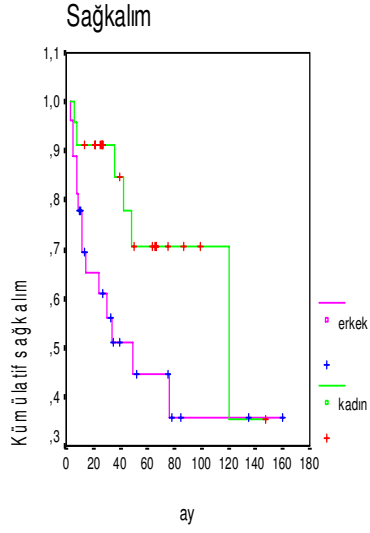
Tablo 4: Hastalara ilişkin tanımlayıcı özellikler

Olguların Özellikleri	Olgu sayısı (n=50)	%
Yaş grubu		
15-24	2	4.0
25-34	1	2.0
35-44	5	10.0
45-54	16	32.0
55-64	8	16.0
65-74	11	22.0
75-84	6	12.0
85+	1	2.0
Yaş grubu 65		
<65	32	64.0
≥65	18	36.0
Cinsiyet		
Kadın	23	46.0
Erkek	27	54.0
Sağkalım		
Hayatta	30	60.0
Hayatta değil	20	40.0
DBBH alt grupları		
GMK	16	32.0
NGMK	26	52.0
Sınıflandırılmayan	8	16
Bcl-2		
≤%30	31	62.0
>%30	19	38.0

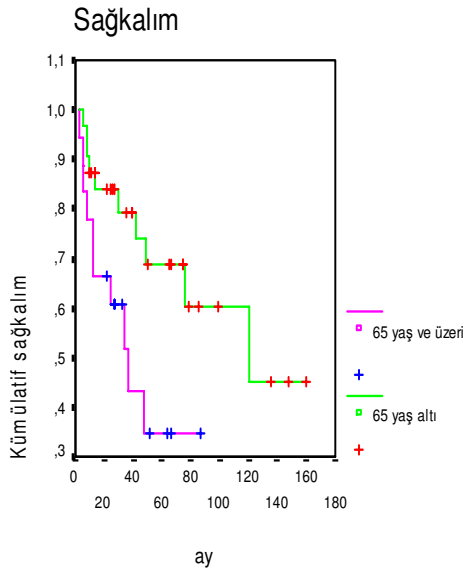
CD3		
0	5	10.0
1	16	32.0
2	13	26.0
3	16	32.0
COX-2		
<%10	20	40.0
%10-50	15	30.0
>%50	15	30.0
Survivin		
<%30	26	52.0
≥%30	24	48.0
Ki-67		
%0-49	32	64.0
%50-79	14	28.0
%80-100	4	8.0

Kadın hastalarda sağkalım %73.9 iken, erkek hastalarda %48.15 idi (Grafik 1). Prognoz üzerine etkili olduğu bildirilen faktörlerin tek tek değerlendirildiği Log Rank Analizi sonuçlarına göre, kadın hastalarda sağkalım erkek hastalara göre sınırda anlamlı olarak bulundu ($p=0.05$).

65 yaş altı hastalarda sağkalım %68.75 olarak saptanırken 65 yaş ve üzeri hastalarda sağkalım %44.44 olarak saptandı (Grafik 2). Log Rank Analizine göre 65 yaş altındaki hastaların, 65 yaş ve üzerindeki hastalara göre sağkalımları anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0.03$).



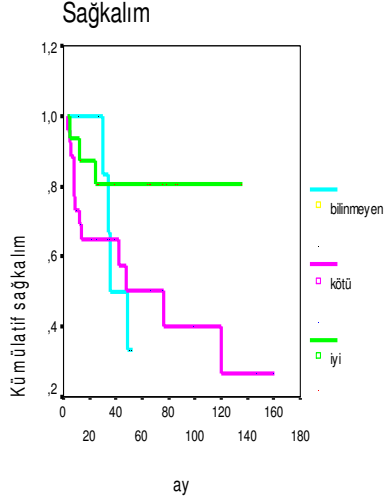
Grafik 1: Cinsiyet ile sağkalım arasındaki ilişkiye yönelik Kaplan Meier sağkalım eğrisi



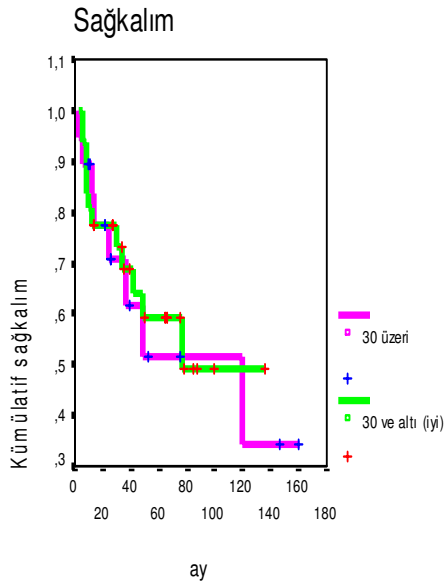
Grafik 2: 65 yaş grubu ile sağkalım ilişkisine yönelik Kaplan Meier sağkalım eğrisi

Hastaların GMK olan alttipinde sağkalım %81.25, NGMK alttipinde %50 ve sınıflandırılmayan alttipinde %50 olarak izlendi (Grafik 3). Log Rank Analizine göre bu fark anlamlı değildi ($p=0.14$).

Bcl-2 %30 ve altı olan hastalarda sağkalım %61.29, %30 üzeri olanlarda %57.89 idi (Grafik 4). Log Rank Analizine göre bu iki grup arasında anlamlı fark görülmedi ($p=0.78$).

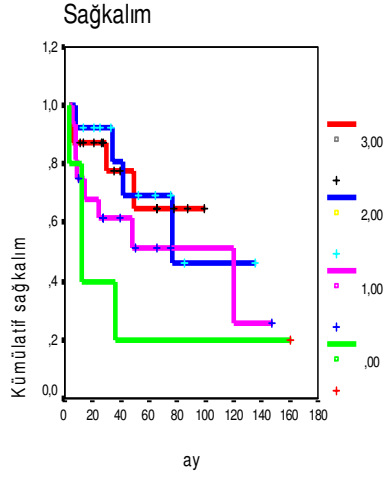


Grafik 3: DBBHL alttıpleri ile sağkalım arasındaki ilişkiye ait Kaplan Meier sağkalım eğrisi



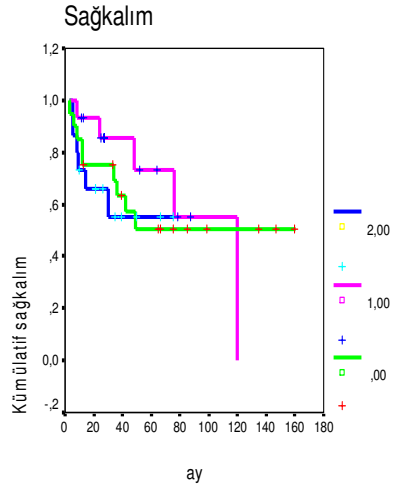
Grafik 4: Bcl-2 ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier sağkalım eğrisi

CD 3 değeri değerlendirilirken hiç boyanma izlenmeyen 0 olarak kabul edilen grupta sağkalım %20, birinci grupta %50, ikinci grupta %69, üçüncü grupta ise %75 idi (Grafik 5). Log Rank Analizine göre bu fark anlamlı bulunmadı ($p=0.18$).



Grafik 5: CD3 (+) lik oranı ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier sağkalım

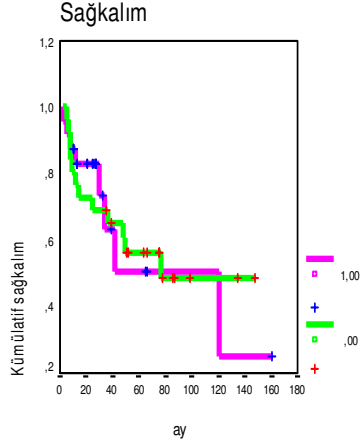
Hastalarda COX-2 ekspresyonlarına göre yapılan gruplandırmada <10 olanlarda sağkalım %55,0, $10-50$ olanlarda %66,67, >50 olanlarda ise %60 olarak saptandı (Grafik 6). Log Rank Analizine göre bu fark anlamlı bulunmadı ($p=0,61$).



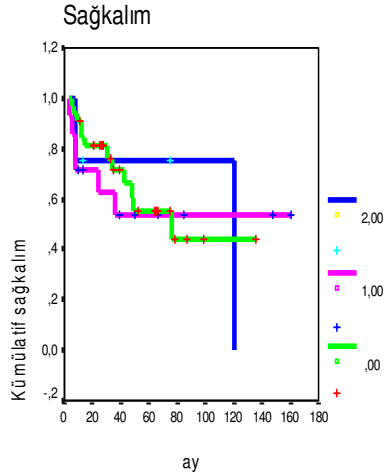
Grafik 6: COX-2 grupları ve sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier sağkalım eğrisi

Survivin'i <%30 eksprese edenlerde sağkalım %53.85, %30 ve üzeri eksprese edenlerde %66.67 olarak saptandı (Grafik 7). Bu fark Log Rank Analizine göre anlamlı bulunmadı (p=0.97).

Ki-67'i %0-49 yoğunlukta eksprese edenlerde sağkalım %62.50, %50-79 yoğunlukta eksprese edenlerde sağkalım %57.14 ve >%80 eksprese edenlerde sağkalım %50.0 idi (Grafik 8). Log Rank Analizine göre anlamlı fark saptanmadı (p=0,95).



Grafik 7: Survivin ekspresyon farkı ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier sağkalım eğrisi



Grafik 8: Ki-67 ekspresyon yoğunluğu ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan Meier sağkalım eğrisi

Lenfoma hastalarının sağkalımlarını etkileyen etmenleri belirlemek amacıyla yapılan Cox Regresyon Analizinde modele yaş (65 yaş altı/65 üstü), cinsiyet (kadın/erkek), DBBHL alt grupları (GMK, NGMK, sınıflandırılmayan), COX-2 (<%10, %10-50, >%50), survivin (<%30, ≥%30), bcl-2(≤%30,>%30), CD3 (0,1,2,3) ve Ki67(%0-49,%50-79, %80-100) değişkenleri alınmıştır. Analiz “enter” yöntemi ile yapılmıştır.

Analiz sonucuna göre 65 yaş ve üzerinde olan hastaların 65 yaş altındakilere göre ölüm riski anlamlı olarak 14 kat daha fazladır (OR=13.96, %95 Güven aralığı 2.92 – 66.63). Cinsiyetler arasındaki karşılaştırmada erkek hastaların kadın hastalara göre ölüm riski anlamlı olarak 5 kat daha fazladır (OR=4.99, %95 Güven aralığı=1.34-18.60). DBBHL alt tipleri arasındaki karşılaştırmada NGMK hastaların GMK hastalara göre ölüm riski anlamlı olarak 12 kat daha fazladır (OR=12.42, Güven aralığı=2.14-71.78). Geri kalan etmenlerin ise sağkalım üzerine etkili olmadıkları görüldü (Bcl-2, CD3, COX-2, survivin ve Ki 67) (Tablo 5).

Tablo 5: Yaş, cinsiyet, DBBHL alttipleri, COX-2, survivin, bcl-2, CD3 ve Ki-67'nin sağkalım üzerine etkilerini gösteren Cox Regresyon Analizi

Özellik (Referans grup)	p	Olasılıklar oranı	% 95 Güven Aralığı
Yaş (65 yaş altı)	0.001	13.96	2.92 – 66.63
Cinsiyet (Kadın)	0.017	4.99	1.34 – 18.60
DBBHL alt grup			
GMK		1.00	
NGMK	0.005	12.42	2.14-71.78
Sınıflandırılmayan	0.094	4.66	0.76-28.31
COX-2			
<%10		1.00	
%10-50	0.380	0.49	0.10-2.36
>%50	0.547	1.61	0.34-7.64
Survivin	0.099	0.33	0.09-1.22
Bcl-2	0.302	0.50	0.14-1.83
CD3			
0		1.00	
1	0.89	0.87	0.11-6.44
2	0.21	0.31	0.05-1.95
3	0.83	0.80	0.10-6.07
Ki-67			
%0-49		1.00	
%50-79	0.61	1.39	0.38-4.98
%80-100	0.12	4.78	0.63-35.90

DBBHL alt tipleri arasında survivin, COX-2, bcl-2 ve CD3 ifadesi açısından fark olup olmadığı Çok Gözlü Düzlemlerde Ki-Kare analizi ile değerlendirilmiştir.

DBBHL alttiplerinde survivin ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ($p=0.584$) (Tablo 6).

Tablo 6:DBBHL alttiplerinde survivin ekspresyonu

DBBHL alttipleri	survivin				Toplam	
	30 altı		30 ve üstü		Sayı	%
	Sayı	%	Sayı	%		
GMK	10	62.5	6	37.5	16	100.0
NGMK	12	46.2	14	53.8	26	100.0
Sınıflandırılmayan	4	50.0	4	50.0	8	100.0
Toplam	26	52.0	24	48.0	50	100.0

Ki-kare:1.076 SD:2 $p=0.584$

COX-2 ekspresyonu değerlendirilirken %10'un altı ile %10 ve üstü olmak üzere gruplar ikiye indirildi. Buna göre DBBHL alttipleri arasında COX-2 ekspresyonu açısından anlamlı fark izlenmedi ($p=0.625$) (Tablo 7).

Tablo 7:DBBHL alttiplerinde COX-2 ekspresyonu

DBBHL alttipleri	COX-2				Toplam	
	10 altı		10 ve üstü		Sayı	%
	Sayı	%	Sayı	%		
GMK	5	31.3	11	68.8	16	100.0
NGMK	12	46.2	14	53.8	26	100.0
Sınıflandırılmayan	3	37.5	5	62.5	8	100.0
Toplam	20	40.0	30	60.0	50	100.0

Ki-kare:0.942 SD:2 $p=0.625$

Ki-67 indeksini değerlendirirken %50'nin altı ile %50 ve üzeri olmak üzere 2 ana grup oluşturuldu. DBBHL alttıplerinde Ki-67 indeksi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ($p=0.599$) (Tablo 8).

Tablo 8:DBBHL alttıplerinde Ki-67 ekspresyonu

DBBHL alttıpleri	Ki-67				Toplam	
	50 altı		50 ve üstü		Sayı	%
	Sayı	%	Sayı	%		
GMK	11	68.8	5	31.3	16	100.0
NGMK	15	57.7	11	42.3	26	100.0
Sınıflandırılmayan	6	75.0	2	25.0	8	100.0
Toplam	32	64.0	18	36.0	50	100.0

Ki-kare:1.026 SD:2 $p=0.599$

CD3 değerlendirilirken hiç CD3 pozitif hücre içermeyenler ve pozitive içerenler şeklinde iki grup belirlendi. Buna göre DBBHL alttıpleri arasında CD3 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ($p=0.829$)(Tablo 9).

Tablo 9:DBBHL alttıplerinde CD3 ekspresyonu

DBBHL alttıpleri	CD3				Toplam	
	negatif		pozitif		Sayı	%
	Sayı	%	Sayı	%		
GMK	1	6.3	15	93.8	16	100.0
NGMK	3	11.5	23	88.5	26	100.0
Sınıflandırılmayan	1	12.5	8	87.5	8	100.0
Toplam	5	10.0	45	90.0	50	100.0

Ki-kare:0.374 SD:2 $p=0.829$

Benzer şekilde DBBHL alttipleri arasında bcl-2 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ($p=0.128$) (Tablo 10).

Tablo 10:DBBHL alttiplerinde bcl-2 ekspresyonu

DBBHL alttipleri	Bcl-2				Toplam	
	30 ve altı		30 üstü		Sayı	%
	Sayı	%	Sayı	%		
GMK	13	81.3	3	18.8	16	100.0
NGMK	13	50.0	13	50.0	26	100.0
Sınıflandırılmayan	5	62.5	3	37.5	8	100.0
Toplam	31	62.0	19	38.0	50	100.0

Ki-kare:4.107 SD:2 $p=0.128$

Sonuç olarak; DBBHL alttipleri arasında, survivin ekspresyonu ($p=0.589$), COX-2 ekspresyonu ($p=0.760$), Ki-67 ekspresyonu ($p=0.599$), CD3 ekspresyonu ($p=0.829$) ve bcl-2 ekspresyonu ($p=0.128$) açısından Çok Gözlü Ki-Kare analizine göre istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir.

TARTIŞMA

ALTTIPLER:

DBBHL, NHL'ların en sık görülen tipidir. Hastaların %40'ının tedaviye cevapları çok iyi olup uzun sağkalıma sahipken, kalanlarının tedaviye cevapları kötü olup hastalıktan dolayı kısa sürede kaybedilirler (59).

Klinik davranışları, histomorfolojik özellikleri, genetik anormallikleri, tedaviye cevapları ve prognozları farklılık gösteren heterojen bir yapıda olan bu tümörün klinik göstergeler ışığında yapılan IPI skorlamasına göre aynı prognostik skora sahip hastalar arasında farklı sağkalım sürelerinin olması hastalığın prognozunu etkileyen çeşitli moleküler ve genetik belirleyiciler üzerine araştırmalar yapılmasını gerekli kılmıştır. Yapılan çalışmalar; genetik ve moleküler heterojenitenin, hastalığın agresifliğinde ve tümör progresyonunda etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca moleküler ve genetik belirleyiciler hastaların sağ kalımını belirlemede de değerli olduğu düşünülmektedir (21).

Alizadeh ve arkadaşları (ark.)(45) DBBHL'ların gen ekspresyon profillerine göre alt gruplara ayrılabilceğini göstermiştir. Buna göre DBBHL'lar germinal merkez B hücre benzeri, aktive B hücre benzeri ve tip 3 olarak alt gruplara ayrılabilir. Germinal merkez benzeri gen ekspresyon profiline sahip hastaların prognozu, aktive B hücre benzeri gen ekspresyon profiline sahip hastalardan çok daha iyidir. Tip 3 olarak beltilen grup heterojendir ve iyi tanımlanmamış olmakla birlikte bu gruptaki hastaların prognozu aktive B hücre benzeri gen profiline sahip hastalar ile benzerdir. Rosenwalt ve ark. da (85) geniş hasta serileri ile yaptıkları incelemede bu sonucu doğrulamıştır. Diğer çoğu çalışmada bunu doğrular şekilde göstermiştir ki, gen ekspresyon profili DBBHL'lı hastaların kemoterapi sonrası sağkalımlarını önceden tahmin edebilmektedir.

Gen ekspresyon profili çalışmaları için taze frozen dokuları kullanılmaktadır ve oldukça pahalı olan cDNA microarray tekniği gereklidir. Bu nedenle klinik ve laboratuvar ortamda pratik değildir (59). Bununla birlikte klinik ve laboratuvarlarda uygulanabilecek, çok daha ucuz ve kullanımı kolay olan İHK'sal belirleyiciler parafine gömülü dokularda rahatça kullanılabilir (59). Buna göre germinal merkez kaynaklı B hücrelerini gösteren en iyi belirleyiciler olan CD10 ve bcl-6 antikorları ile aktive B hücrelerinde eksprese edildiği gösterilen MUM-1 antikorunu; GMK ve NGMK ayırımını yapmada kullanılabilir (59).

Chang ve ark.nın (59) yaptığı çalışmaya göre; germinal merkez ve aktivasyon belirleyicilerinin kombinasyonu prognostik bilgiyi sağlamak için gereklidir. Hastaları ekspresyon paternlerine göre patern A (CD10 ve/veya bcl-6 (+), MUM-1 (-)), patern B (en az bir germinal merkez belirleyicisi (+), aktivasyon belirleyicilerinden birisi (+)) ve patern C (MUM-1 ve/veya CD138(+), germinal merkez belirleyicileri (-)) olmak üzere üç gruba ayırmışlardır. Tek değişkenli analizde CD10 (+), MUM-1 (-) ve IPI skoru düşük hastalarda ölüm riski relatif olarak düşük bulunmuştur. Bununla birlikte bcl-6 veya diğer bir aktivasyon belirleyicisi olan CD138 ekspresyonu ile sağkalım arasında etkileşim olmadığını, Patern B ve patern C'nin arasında da sağkalım açısından belirgin fark olmadığı bildirilmiştir. Çok değişkenli analizde patern A daki hastaların ölüm riski patern B ve C' e göre relatif olarak düşük bulunmuştur. Bunun yanısıra ekspresyon paterni ile IPI arasında ilişki kurulamamıştır.

Hans ve ark. (54) çalışmalarında GMK ve NGMK olarak iki grup oluşturmuşlardır. CD10 (+) olduğu yada CD10 ve bcl-6'nın her ikisinin de (+) olduğu olgular yanı sıra CD10(-), bcl-6 (+) olup MUM-1 (-) olgular GMK gruba alınırken, CD10 ve bcl-6 (-) yada CD10(-), bcl-6 (+) olup MUM-1'ide (+) olan olgular NGMK olarak ayrılmıştır. GMK grubun 5 yıllık sağkalımı NGMK gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Eş zamanlı olarak aynı olgular cDNA microarray yöntemiyle de alt gruplara ayrılmıştır ve bunlar İHK'sal yöntemle ayrılan alt gruplar ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak İHK'sal yöntemin de alt grupları belirlemede kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Colomo ve ark.'nın (56) yaptığı çalışmada da gruplar germinal merkez-CD10(+), germinal merkez CD10(-), post germinal merkez ve plazmoblastik olarak dörde ayrılmıştır. Bu çalışmada diğerlerinden farklı olarak morfoloji ile immünofenotipik profil arasında sıkı bir ilişki izlenmiştir. Post germinal merkez profiline sahip olanların sıklıkla immünoblastik morfolojide iken germinal merkez CD10(+) profile sahip olanların sentroblastik morfolojide olduğu dikkati çekmiştir. DBBHL subtipleri arasında ise tedaviye cevap ve prognoz açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Biz araştırmaya aldığımız 50 olguyu GMK (CD10 ve/veya bcl-6 (+), MUM-1 (-), NGMK (CD10 ve bcl-6 (-), MUM-1(+)) olgular yanı sıra CD10 (-), bcl-6 (+) olup MUM-1 (+)olan olgular) ve sınıflandırılmayan (CD10, bcl-6 ve MUM-1 (-)) olmak üzere üç alt grup belirledik. 50 olgunun 16'sı GMK (%32), 26'sı NGMK (%52) ve 8'i sınıflandırılmayan (%16) gruba girdi. Tek değişkenli analize göre hastaların

sağkalımında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ($p=0.14$). Bununla beraber GMK grupta sağkalım oranı %81.25 iken NGMK ve sınıflandırılmayan alttiplerinde sağkalım oranı eşit olarak izlendi (%50). Çok değişkenli analizde ise NGMK hastaların GMK hastalara göre ölüm riski anlamlı olarak daha fazla (12 kat) bulundu ($p=0.005$). Fakat bu fark sınıflandırılmayan grupta izlenemedi ($p=0.094$). Bu sonuçlar daha önce yapılan ve literatürde yer alan diğer pek çok çalışmanın sonuçları ile uyumludur.

GMK grubun neden daha iyi prognoza sahip olduğu henüz tam açıklanamasa da bunun artmış apoptoz ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (83).

PROLİFERASYON HIZI İLE İLİŞKİ

Ki-67 faktörü: Ki-67 antijeni G1, S, G2 ve mitoz fazındaki hücrelerin nükleuslarında saptanan bir proteindir. Ki-67 proliferasyon hızının prognozla ilişkisine dair yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar vardır. Yüksek proliferasyon indeksinin agresif lenfomalarda sağkalım düşüklüğü ile birliktelik gösterdiğini bildiren çalışmalar olduğu gibi birkısım çalışmada da düşük proliferasyon indeksinin düşük sağkalım ile birliktelik gösterdiği belirtilmiştir (69,86). Bazı araştırmacılar ise proliferasyon indeksinin IPI'e ek prognostik bilgi vermediğini ileri sürmüştür (14).

Bizim çalışmamızda 50 hastanın 32'sinde (%64) Ki-67 ekspresyonu %0-49 arasında iken sadece 4 hastada %80'in üzerinde Ki-67 ekspresyonu saptandı. Yüksek Ki-67 indeksine sahip bu hastalardan ikisi GMK olup hayatta iken diğer ikisi NGMK ve hayatta değildi. Sonuçta tek değişkenli ve çok değişkenli analizde, Ki-67 indeksinin sağkalım üzerine istatistiksel olarak anlamlı etkisi olmadığı görüldü.

Bizim sonucumuza benzer şekilde Ki-67 indeksinin hasta sağkalımında prognostik değeri olmadığını bildiren çok sayıda yayın vardır. Bunlardan birisi olan Nordic lenfoma grup çalışmasında DBBHL'larda Ki-67 ekspresyonunun rolü araştırılmış ve Ki-67 ekspresyonunun 5 yıllık sağkalımda belirgin etkisinin olmadığı bildirilmiştir (87). Hans ve ark. (88) 200 DBBHL hastasında, %50 sınır değerini kullanarak, Ki-67 indeksini değerlendirmişler ve Ki-67 indeksinin sağkalım ve hastalısız sağkalım üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkisinin bulunmadığını bildirmişlerdir.

Buna karşın Zhang ve ark.(48) düşük proliferasyon aktivitesi olan hastaların (<%10 Ki-67 ekspresyonu) yüksek proliferasyon aktivitesi olan hastalara göre daha kısa sağkalıma sahip olduğunu, fakat değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı

olmadığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Miller ve ark.nın (89) yaptığı 60 hastadan oluşan çalışmalarında, Ki-67 indeksi %80 ve üzerinde olan hastaların 3 yıllık sağkalımlarının belirgin olarak azaldığı saptamıştır.

Sonuç olarak Ki-67 indeksinin düşük veya yüksek olmasının sağkalımı nasıl etkilediği tam anlaşılamamıştır. Bazı araştırmacılar düşük proliferasyon hızına sahip hastaların tedavisindeki başarısızlığın sebebini tümör hücrelerinin çoğunun G0/G1 fazında olmasına ve bu nedenle tümör hücrelerinin kemoterapötiklere cevap vermemesine bağlı olduğunu söylerken, Ki-67 indeksi yüksek bulunan hastalarda tedavi başarısızlığı olduğunu söyleyen araştırmacılar; bunun tümörde yeni gelişen mutasyonlara ve tümörde yeniden büyümeye bağlı olduğunu söylemektedir (21,87). Jerkeman ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise hem düşük (<%60) hem de yüksek (>%90) derecedeki proliferasyon hızı prognoz ile ilişkili bulunmuştur (87).

Çalışmamızda ayrıca belirlediğimiz DBBHL alttipleri arasında Ki-67 proliferasyon hızı açısından fark olup olmadığını Ki-Kare istatistiksel analizi ile değerlendirmek için olguları Ki-67 antikorunu %50'nin altı ile %50 ve üzerinde ekspresyon edenler şeklinde iki gruba ayırdık. Buna göre DBBHL alttipleri arasında Ki-67 indeksi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark izlemedik ($p=0.599$). Buna karşın Colomo ve ark.(56) yaptığı çalışmada ise CD10(+) germinal merkez profiline sahip olgularda (CD10 ve bcl 6(+)) Ki-67 indeksi, CD10(-) germinal merkez profili (CD10(-), bcl 6(+)) ve postgerminal merkez profiline (CD10(-), bcl 6(+/-), MUM 1(+)) sahip hastalara göre oldukça düşük olarak izlenmiştir. Bununla birlikte Ki-67 ekspresyonu ile hastaların sağkalımları arasında anlamlı bir ilişki saptanmadığı bildirilmiştir. Proliferatif aktivitenin GMK ve NGMK alttipleri arasındaki prognostik farklılıkla ilişkili olmadığını göstermektedir.

APOPTOZ İLE İLİŞKİLİ FAKTÖRLER

Bcl-2 Faktörü: Bir antiapoptotik protein olan bcl-2 ile ilgili yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır (48,56,63,90,91). Çalışmaların sonuçları ise oldukça farklılık göstermektedir.

Bizim çalışmamızda bcl-2 ekspresyonu %30 ve altında olan hastalarda sağkalım oranı %61.29 iken, %30 üzeri olanlarda %57.89 olarak izlendi. Tek değişkenli ve çok değişkenli analizde bu iki grup arasında hasta sağkalımında istatistiksel anlamlı bir fark görülmedi ($p=0.78$, $p=0.302$). Bizim sonucumuza benzer olarak Zhang ve ark.nın (48) 158 hastadan oluşan çalışmalarında da bcl-2 protein

ekspresyonu ile sağkalım ve hastaliksız sağkalım arasında ilişki olmadığı saptanmıştır.

Buna karşın Biasoli ve ark. (63) araştırmalarında IPI'e göre yüksek risk grubunda olan hastaların bcl-2 eksprese ettiğini ve bunların kötü prognozlu olduğunu bildirmiştir. Yine Jerkeman ve ark.'nın (87) yaptığı çalışmada da bcl-2 (+) hastaların, bcl-2 (-) hastalara göre oldukça kötü prognoza sahip olduğu bildirilmiştir. Colomo ve ark.nın (56) araştırmasında da bcl-2 (+) hastalarda 5 yıllık sağkalım %34 iken bcl-2(-) olanlarda %57 olarak saptanmıştır ve bcl-2 ekspresyonunun sağkalım üzerinde kötü prognostik faktör olduğu bildirilmiştir.

Southern blot hibridizasyon analizi ile bcl-2 gen yeniden düzenlenmesinin prognoza etkisini araştıran çalışmaların bir kısmında sağkalıma etkisi olmadığı bildirilirken (32,92,93) bir kısmında ise kötü prognoz ile birliktelik gösterdiği bildirilmiştir (94). Bazı araştırmacılar ise bcl-2 gen yeniden düzenlenmesinin tam tersine iyi prognostik faktör olduğunu söylemektedir (95).

Bcl-2 ekspresyonu İHK'sal yöntemler kullanılarak değerlendirilen bazı çalışmalarda; hasta sağkalımlarında fark olmadığı bildirilirken (96,97), bir kısım çalışmada ise kötü prognozla birlikte olduğunu söylemektedir (53,55,56,69). Barrans ve ark.nın (55) IPI skorlaması ile karşılaştırarak yaptıkları çalışmada IPI skorlamasında orta derecede riskli gruba uyan hastalarda bcl-2 atmış ekspresyonu varsa IPI skorlamasında yüksek riskli grupta olan hastalara benzer şekilde 2 yıllık sağkalımlarında azalma olduğunu bildirmişlerdir .

Çalışmamızda DBBHL alttiplerinde prognostik farkta bcl-2 ekspresyonunun etkili olup olmadığını araştırmak için, belirlediğimiz DBBHL alttiplerinde bcl-2 ekspresyonu açısından fark olup olmadığını değerlendirdik. Buna göre DBBHL alttiplerinde bcl-2 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamadık. Benzer şekilde Colomo ve ark.'nın (56) yaptığı çalışmada da DBBHL alt grupları arasında bcl-2 ekspresyonu açısından anlamlı fark bulunmadığı bildirilmiştir.

Gruplar arasında bcl-2 ekspresyonu açısından fark olup olmadığı microarray yöntemi ile araştıran çalışmalar da vardır. Bunlardan birisi Alizadeh ve ark.'nın (45) cDNA microarray kullanarak yaptıkları çalışmadır. Buna göre germinal merkez benzeri gen ekspresyon profiline sahip DBBHL'ların %29'unda bcl-2 mRNA ekspresyonu bulunurken, aktive B hücreli gen ekspresyon profiline sahip olanlarda bunun %71 olduğunu fakat hasta sayısı az olduğu için istatistiksel olarak DBBHL altgruplarında bcl-2 ekspresyonu açısından anlamlı fark izlenmediği bildirilmiştir. Yine

Hans ve ark.'nın (54) cDNA microarray çalışmasında da alt gruplar arasında bcl-2 protein ekspresyonu açısından belirgin fark izlenmemiştir.

Survivin faktörü: Apoptoz inhibitör protein ailesine üye bir protein olan survivin'in çeşitli kanserlerde artmış ekspresyonu gösterilmiştir. Hematolojik maligniteler arasında ise erişkin T hücreli lenfoma ve lösemiler, HL, Mantle hücreli lenfoma ve yüksek dereceli lenfomalarda artmış survivin ekspresyonu gösterilmiştir (80,87,98).

Survivin ile ilgili yapılan çok sayıdaki çalışmada kabul edilen sınır değer çok farklılık göstermektedir. Aynı zamanda boyanın değerlendirilmesinde de farklılıklar vardır. Bir kısım araştırmacı nükleer boyanmayı, bir kısım araştırmacı sitoplazmik boyanmayı pozitif olarak kabul etmektedir.

Biz hastaları gruplandırırken sınır değer olarak %30'u kabul ettik ve pozitiviteyi değerlendirirken de nükleer boyanmayı göz önüne aldık. Hastalarda survivin'i <%30 eksprese edenlerde sağkalım (%53) , ≥%30 eksprese edenlere göre (%66) daha düşük olarak saptandı. Tek değişkenli ve çok değişkenli analizde hastaların sağkalımı ile survivin arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulamadık. Benzer bir çalışma 2005 yılında yayınlanan Hans ve ark.'nın (88) 200 DBBHL tanılı hasta ile yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada hastaların %65'inde survivin ekspresyonu olduğu ve survivin ekspresyonu ile hastalığın prognozu arasında hiç ilişki bulunmadığı bildirilmiştir.

Bununla birlikte tam tersi sonuçlar bildiren yayınlar da bulunmaktadır. Adida ve ark. (99) tedavi olarak antrasiklin içeren rejim uygulanmış 222 DBBHL olgusunda, survivin ekspresyonu ve prognoza etkisini araştırmışlardır. Survivin'i değerlendirirken sitoplazmik boyanmayı kabul etmişlerdir. Bu çalışmada tedavi sonrası tam remisyon hızı survivin (+) ve (-) grup arasında anlamlı farklılık göstermemiştir. Hastalısız sağkalım ve relaps sonrası sağkalım survivin (+) olgularda diğer gruba göre, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, düşük olarak izlenmiştir. Bununla birlikte çok değişkenli analizde survivin ekspresyonunun; sağkalım üzerine etkili bağımsız kötü prognostik faktör olduğu bildirilmiştir.

Schlette ve ark. (100) primer kutanöz anaplastik büyük hücreli lenfomalı hastalarda survivin ekspresyonunu değerlendirdikleri araştırmalarında, olguların yaklaşık yarısında survivin ekspresyonu bulmuşlar, bununla birlikte western blot analizi ile survivinin ağırlıklı olarak sitoplazmik bulunduğunu bildirmişlerdir. Adida ve ark.'nın (98) bildirdiğine benzer şekilde, anaplastik büyük hücreli lenfomalarda

survivin ekspresyonunun kötü prognostik faktör olduğunu bildirmiştir.

Martinez ve ark. (82) 80 mantle hücreli lenfoma (MHL) tanılı hasta ile yaptıkları çalışmada, olguları klasik MHL ve blastoid varyantlar (blastik ve pleomorfik) olarak gruplara ayırmışlardır. Survivin pozitivitesini değerlendirirken, western blot analizi ile de doğrularak, nükleer boyanmayı pozitif kabul etmişlerdir. Blastik MHL olgularında diğer gruplara daha yüksek seviyede survivin ekspresyonu olduğunu saptamışlardır. Blastik varyantın diğer gruplara göre yüksek proliferatif aktivitesi olduğunu ve klinik olarak daha agresif olduğunu belirterek, yüksek survivin ekspresyonunun sağkalımı azalttığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte istatistiksel olarak, çok değişkenli analizde ise proliferatif aktivitenin daha değerli olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda ayrıca DBBHL alttipleri arasında survivin ekspresyonu açısından fark olup olmadığını değerlendirdik ve DBBHL alttipleri arasında survivin ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını saptadık. Benzer bir araştırma yapan Watanuki ve ark. (83) yaptıkları çalışmalarında, GMK ve NGMK olmak üzere gruplandıkları 60 DBBHL hastasında survivinin prognoza etkisini araştırmışlardır. Survivin pozitivitesini değerlendirirken bizimle benzer şekilde tümör hücrelerinde %30'un üzerinde nükleer boyanmayı pozitif olarak kabul etmişlerdir ve bizim sonucumuzdan farklı olarak, Watanuki ve ark. (82) survivin (+) GMK ve NGMK olguların, survivin (-) olan olgulara göre belirgin kötü prognoza sahip olduğunu bildirmişlerdir (p=0.06, p=0.07).

COX-2 faktörü: Araşidonik asitten PG oluşumunu sağlayan siklooksijenaz enziminin iki tipinden birisi olan COX-2; son zamanlarda yoğun olarak araştırılan, çoğu tümörde varlığı saptanan, tümör biyolojisinde çeşitli basamaklarda rolü olduğu anlaşılan ve çoğu tümörün prognozunda etkili olduğu bildirilen önemli bir enzimdir (70,71,74,76).

Radyoterapi ve COX-2 inhibitörlerinin birlikte uygulandığı hastalarda tümörde intrensek radyosensivitenin arttığı in vitro ve in vivo çalışmalar ile ortaya konulmuştur (101). Çok sayıdaki çalışmada COX-2 ekspresyonu ve apoptozis inhibisyonu arasındaki pozitif korelasyon gösterilmiştir (71). Ayrıca COX-2'nin selektif inhibitörlerinin değişik kanser türlerinde (kolon, mide, prostat gibi) apoptozu uyardıkları da gösterilmiştir (102, 103,104).

Bizim çalışmaya aldığımız 50 hastanın %40'ında %10'un altında COX-2 ekspresyonu izlenmiştir, %30'unda ise %50'nin üzerinde ekspresyon görülmüştür. Oluşturduğumuz gruplar arasında hastaların sağkalım oranları birbirine çok yakındır

(%55, %66, %60). Hastalardaki COX-2 ekspresyonu ile sağkalım arasında, tek değişkenli ve çok değişkenli analize göre, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Hazar ve ark.'nın (74) yaptıkları çalışmada; Hodgkin lenfoma (HL) ve NHL'larda artmış seviyede COX-2 ekspresyonu olduğunu ve COX-2 eksprese eden hastalarda sağkalımın, eksprese etmeyenlere göre, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada tedaviye tam cevap, COX-2 negatif olgularda anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur. Ayrıca hastalığın evresi ile COX-2 ekspresyonu arasında da bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir.

Bununla birlikte Hazar ve ark.'nın (74) çalışmaya aldığı NHL'lı hastaların dağılımı oldukça heterojendir. Hastaların 20 tanesi düşük dereceli (MALT, KLL, FL) , 25 tanesi orta dereceli (diffüz büyük hücreli, diffüz mikst hücreli histolojiye sahip) ve 4 tanesi ise yüksek dereceli (lenfoblastik, anaplastik, Burkitt's lenfoma) NHL'dır. Ayrıca Hazar ve ark.'nın COX-2 eksprese edenlerde sağkalımın daha düşük olarak izlendiğini söylediği süre sadece 2 aylık bir süreyi kapsamaktadır. Oysa bu süre sağkalımı değerlendirmek açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p:0.552).

Wun ve ark.'nın (70) yaptıkları çalışmalarında; hücre kültüründe ürettikleri Burkitt lenfoma hücre serilerini, kontrol grubu olarak periferik kandan topladıkları normal B hücreleri ile karşılaştırmışlardır. Sonuçta tümör hücrelerinde COX-2 ekspresyonunun kontrol grubuna göre 2.2-4.3 kat arttığını, bunun yanı sıra tümör hücrelerinde fosforilize COX-2'nin (aktive form) arttığını da göstermişlerdir. Aynı çalışmada tümör hücrelerine selektif COX-2 inhibitörleri uygulandığında, tümör hücrelerinde proliferasyonda azalma ve apoptozda artma olduğunu saptamışlardır.

Bununla beraber Wun ve ark.'nın (70) kullandıkları tedavi dozu COX-2 inhibisyonu için gerekli dozdan daha yüksek bir dozdur. COX-2 inhibisyonu için yeterli olan dozda apoptoz indüklenmemektedir. Bu da göstermektedir ki sadece COX-2 inhibisyonu apoptoz için yeterli değildir. Selektif COX-2 inhibitörü olan celecoxip'in yüksek dozu henüz bilinmeyen diğer mekanizmalarla ve belki de COX-2 inhibisyonu dışındaki mekanizmalarla apoptozu indüklemektedir (105).

Uzun süre nonsteroid antiinflamatuvar (NSAİD) kullanımının kolon/rektum kanseri, pankreas kanseri, prostat kanseri gibi bazı kanserlerin gelişim riskini azalttığını söyleyen çalışmalar vardır (106). Bu durum NSAİD'lerinin COX-2 enzim

aktivitesini inhibe etmesine bağlanmıştır. Oysa “*in-vivo*” ve epidemiyolojik çalışmalarda COX-2 selektif olmayan NSAİD kullanımı sonrasında da kolorektal karsinomu, özefagus karsinomu, mesane ve akciğer karsinomu gelişim insidansının düştüğü bildirilmiştir (106).

NSAİD kullanımı ve NHL arasındaki ilişkiyi inceleyen araştırmalarda, selektif NSAİD kullanımı ile NHL gelişim riskinin düştüğünü bildirenler olduğu gibi aralarında hiç ilişki olmadığını belirtenler ve riskin arttığını belirtenler de vardır (106).

2006 Şubat ayında Flick ve ark. tarafından yayınlanan araştırmada 1000 NHL hastası 1060 kişilik kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve uzun dönem NSAİD kullanımı ile, kadın veya erkeklerde, NHL gelişimi arasında ilişki olmadığını bildirmiştir. Çalışmada COX-2 inhibitörleri, nonselektif NSAİD’ler, kombine kullanımlarda göz önüne alınmıştır (106).

Görüldüğü üzere COX-2 enzimi ile yapılan çok sayıda çalışma ve çok sayıda farklı sonuçlar bildirilmektedir. Çoğu tümörde eksprese edildiği tespit edilen COX-2’ nin tümör gelişiminde değişik basamaklarda etkili olduğu bildirilmiş olsada, NSAİD kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalarda anlaşılmıştır ki; COX-2 spesifik olmayan ilaçların kullanımı sonrasında da tümör gelişim insidansında gerileme olmuştur. Bu da bize tek başına COX-2’nin tümör gelişiminde etkili olmadığı fakat henüz açıklanamayan yollarla çoğu nonhematojen olan çeşitli tümörlerin prognozunu etkilediğini düşündürmektedir. Çalışmamızda sağkalımları arasında belirgin fark olan DBBHL alttiplerinde COX-2 ekspresyonu açısından fark olup olmadığına baktığımızda ise DBBHL alttipleri arasında COX-2 ekspresyonu açısından istatistiksel anlamlı fark olmadığını saptadık. DBBHL alt tipleri arasında COX-2 ekspresyonu farklılığını araştıran başka bir çalışmaya literatürde rastlanmadı. Bununla beraber DBBHL’larda COX-2 ekspresyonu ile ilgili olarak da az sayıda çalışma bulunmaktadır (74). Bu nedenle COX-2’nin DBBHL’ların prognozu üzerindeki etkisi konusunda çok fazla bilinmeyen vardır ve buna dair daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

DİĞER FAKTÖRLER

CD3 Faktörü: Çeşitli solid organ tümörlerinde eşlik eden immün cevabın prognoza etkisi araştırılmış ve farklı sonuçlar bildirilmiştir. Lee ve ark. (107) invaziv meme karsinomlarında tümöre eşlik eden inflamatuvar infiltratın yoğunluğu (infiltrat minimal veya yok-hafif-orta-şiddetli) ile sağkalımı karşılaştırmışlardır. Orta veya şiddetli diffüz inflamatuvar infiltrat bulunan meme tümörlerinde prognozun daha iyi olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın Scholl ve ark. (108) ise yaptıkları çalışmada

meme karsinomlu olgularda tümörde artan T hücre oranı ile düşük sağkalım birlikteliğini bildirmiştir. Buna karşın literatürde, hematojen tümörlerde tümöre eşlik eden inflamatuvar hücrelerin prognostik önemini araştıran fazla çalışma yoktur. DBBHL'larda ise böyle bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda ise DBBHL'larda tümöre eşlik eden CD3 (+) T hücrelerinin yoğunluğunu ve bu yoğunluğun prognoz üzerine etkisinin olup olmadığını araştırdık ve bunun için dört grup oluşturduk. Tümör zemininde hiç T hücresi içermeyen grupta izlenen %20'lik sağkalımın, artan T hücre miktarıyla orantılı olarak arttığını gördük (%50, %69, %75). İstatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da sağkalım yüzdelerine bakıldığında gruplar arasında belirgin fark olduğu izlendi. Sonucun istatistiksel olarak anlamlı çıkmamasının nedeninin; hasta sayısının yeterli olmamasına bağlı olabileceği gibi oluşturulan grup sayısının fazla olmasına da bağlı olabileceği düşünüldü.

Ki ayrıca çalışmamızda olguları, tümörde CD3 (+) T hücre içermeyen ve içerenler şeklinde olmak üzere iki gruba ayırdık ve DBBHL alttipleri arasında bu açıdan fark olup olmadığını araştırdık. Buna göre DBBHL alttipleri arasında CD3 (+) T hücrelerin eşlik edip etmemesi açısından istatistiksel bir fark olmadığını belirledik.

Çalışmamızın sonuçlarına genel olarak baktığımızda DBBHL'lara eşlik eden artmış CD3 (+) T hücrelerin hastaların sağkalımını, her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı bulmasak da, etkileyebileceğini düşündük. DBBHL alttiplerinin prognozlarının farklılığını ise immün cevabın oranı ile ilişkilendiremedik.

B hücreli periferel NHL'ları, HL ve periferel T hücreli NHL'lardan ayırt eden morfolojik özelliklerden biri de tümöre eşlik eden inflamatuvar hücrelerin seyrek görülmesi olarak kabul edilir. Ancak bu çalışmada DBBHL olgularında tümöre değişen oranlarda CD3 (+) T hücrelerin eşlik ettiği görüldü. Hematojen bir tümörde özellikle nodal lenfomalarda zemindeki T hücrelerin tümöre karşı immün yanıtı temsil edip etmediklerine bizimki gibi semikantitatif bir çalışma ile karar vermek mümkün değildir ve bunun için hücrelerin fonksiyonel olarak araştırıldıkları çalışmalara gereksinim vardır. Ancak benzer semikantitatif metodlar kullanan solid organ tümörlerinde bildirildiği gibi DBBHL'larda eşlik eden CD3(+) T hücrelerin hastaların sağkalımını, her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı bulmasak da, etkileyebileceğini düşündük. DBBHL alt tipleri arasında CD3 (+) T hücrelerin yoğunluğu yönünden fark olmayışı, CD3(+) T hücrelerin alt tiplerin prognozlarının farklı oluşunda rol oynamadığını düşündürdü.

Yaş Faktörü: DBBHL'ların prognozunu belirlemek için IPI skorlaması kullanılmaktadır. IPI skorlaması DBBHL'larda oldukça yararlı klinik prognostik belirleyicidir ve sağ kalımın bağımsız belirleyicileri olan, kolaylıkla elde edilebilen klinik-labaratuar göstergeler ile değerlendirilir (39). IPI skorlamasında kullanılan değerlerden biriside yaştır ve 60 yaş üstü kötü prognostik faktör olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte genç hastalara çok daha agresif tedavilerin uygulanabildiğinde göz önünde bulundurulmalıdır.

Bizim çalışmamızda da tek değişkenli ve çok değişkenli analize göre 65 yaş altındaki hastaların, 65 yaş ve üzerindeki hastalara göre sağkalımları anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0.03$, $p=0.001$). 65 yaş ve üzerindeki hastalarda oldukça yüksek oranda (14 kat) artmış ölüm riski izlenmiştir. Bu da IPI skorlaması ile uyumlu bulunmuştur.

Benzer şekilde Zhang ve ark.'nın (48) yaptığı çalışmada çok değişkenli analizde yaş faktörünün sağkalım ve hastalısız yaşam üzerine en etkili faktör olduğu, ikinci en etkili faktörün ise IPI skorlaması olduğu bildirilmiştir. Yine Colomo ve ark. (56) hastalığın gidişatını etkileyen çeşitli klinik değişkenleri değerlendirmişlerdir. Hastaların 60 yaş üzerinde olması sağkalımlarını anlamlı şekilde etkilemektedir. Tüm değişkenler ele alındığında ise IPI skorlamasının sağkalım üzerinde yüksek oranda etkili olduğu gösterilmiştir.

Cinsiyet faktörü: DBBHL erkeklerde daha sık olarak izlenmektedir. IPI skorlamasında hastalarla ilgili yaş, performans durumu gibi çeşitli klinik değişkenler değerlendirilmektedir. Fakat hastaların cinsiyeti bu skorlamada bulunmamaktadır. DBBHL ile ilgili yapılan çok sayıdaki çalışmada da hastaların cinsiyetlerinin prognoz üzerine etkili olup olamayacağı değerlendirilmemiştir.

Bizim araştırmamıza aldığımız 50 olgunun 23'ü kadın, 27'si erkektir. Kadın hastalarda sağkalım oranı %73.9 iken, erkek hastalarda bu oran %48.1 olarak saptanmıştır. Çok değişkenli analizde erkek hastalarda ölüm riski, kadın hastalara göre 5 kat artmış olarak izlenmiştir. Tek değişkenli ve çok değişkenli analize göre kadın hastalarda sağkalım, erkek hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.05$, $p=0.017$).

Benzer şekilde Tomita ve ark.'nın (109) yaptığı 177 DBBHL tanılı hastadan oluşan çalışmada erkek cinsiyet, çok sayıda ektranodal yayılım bölgesinin bulunması ve B semptomlarının olması sağkalım üzerine kötü prognostik faktörler olarak bildirilmiştir.

SONUÇ:

Sonuç olarak DBBHL hastalarının prognozunu belirlemede klinik bilgilerle değerlendirilen IPI skorlaması oldukça faydalıdır. Çalışmamızda IPI skorlamasında bulunan yaş faktörünün prognozu etkilediği saptanmıştır. Bununla birlikte IPI skorlamasında göz önüne alınmayan cinsiyet faktörünün de prognoza etkili olabileceği bulunmuştur. Ayrıca tümör zemininde bulunan CD3(+) T hücre yoğunluğunda hastaların prognozunu etkileyebileceği düşünülmüştür. Bu konuyla ilgili çeşitli çalışmalar olmakla birlikte hematojen tümörlerde tümöre eşlik eden lenfosit, histiosit vb. immün yanıtla ilişkili hücrelerin prognozla ilişkisi konusunda literatür çalışması olmadığı görülmektedir. Bunların dışında yapılan çok sayıdaki çalışmada ve bizim çalışmamızda da izlenmiştir ki; DBBHL'ların alttipleri arasında belirgin prognostik fark bulunmaktadır. Alttipler arasındaki prognoz bu kadar farklı olmasında antiapoptotik faktörler (bcl-2, survivin), tümör proliferatif aktivitesi (Ki-67) ve COX-2 ifadesinin etkili olup olmadığı bu çalışmada araştırılmış, fakat gruplar arasında araştırılan faktörler açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bunlarla ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmiş ve ortak bir sonuca ulaşılamamıştır. Bu da göstermektedir ki gruplar arasındaki bu farka neden olabilecek mekanizmaları açıklayabilmek için daha fazla çalışma gerekmektedir. Fakat şu bir gerçektir ki, hastaların takibi ve tedavi planlanmasında IPI skorlamasına ek olarak artık DBBHL alttipleri de göz önüne alınmalıdır.

KAYNAKLAR

1. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2002. Atlanta, Ga: American Cancer Society;2002.
2. Armitage JO, Weisenburer DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. J. Clin. Oncol. 1998;16:2780-2795.
3. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Fladrin G, et al. Lymphoma classification-from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO Classification of lymphoid neoplasms. Ann Oncol. 2000;11:3-10.
4. Clarke CA, Glaser SL. Changing incidence of non-Hodgkin lymphomas in the United States. Cancer 2002;94:2015-2023.
5. Groves FD, Linet MS, Travis LB, Devesa SS. Cancer surveillance series: non-Hodgkin's lymphoma incidence by histologic subtype in the United States from 1978 through 1995. J Natl Cancer Inst. 2000;92:1240-1251.
6. Howel HL, Wingo PA, Thun MJ. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. J Natl Cancer Inst. 2001;93:824-842.
7. Evans LS and Hancock BW (2003)"Non-Hodgkin lymphoma" Lancet 2003;362,139-146.
8. Ansell SM, Armitage J. Non-hodgkin lymphoma:diagnosis and treatment. Mayo Clinic Proceedings. 2005;80 (8):1087-1097.
9. Stolte M, Bayerdorffer E, Morgner A. Helicobacter and gastric MALT lymphoma. Gut. 2002;50:19-24.
10. Couser JB, Casey TT, Macon WR, Mccurley TL, Swerdlow S.H. Lymph Nodes. In:Mills S.E.,Carter D., Reuter V.E., Greenson J.K., Stoler M.H., Oberman H.A.,edt.Sternberg's diagnostic surgical pathology. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins,2004:777-848.
11. Opelz G, Henderson R. Incidence of non-Hodgkin lymphoma in kidney and heart transplant recipients. Lancet. 1993;342:1514-1516.
12. Cote TR, Biggar RJ, Rosenberg PS. AIDS/Cancer Study Group.Non-Hodgkin's lymphoma among people with AIDS: incidence, presentation and public health burden.Int J Cancer.1997;73:645-650.
13. Richardson ME, Chen QG, Filippa DA. Intermediate-to high-grade histology of

- lymphomas carrying t(14;18) is associated with additional nonrandom chromosome changes. *Blood*. 1987;70:444-447.
14. Winter JN, Andersen J, Variakojis D, Gordon LI, et al. Prognostic implications of ploidy and proliferative activity in the diffuse, aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1996;88:3919-3925.
 15. Yunis JJ, Frizzera G, Oken MM, McKenna J, et al. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma: a possible model for cancer. *N Engl J Med*. 1987; 316:79-84.
 16. Chan JKC The new world health organization classification of lymphomas: the past, the present and the future. *Hematol Oncol* 2001;19:129-150.
 17. Gatter KC, Warnke RA. Diffuse large B-cell lymphoma. In: Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W., ed. *Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. World Health Organization classification of tumours. Lyon: IARC, 2001:171-174.
 18. Engelhard M, Brittinger G, Huhn D, Gerhartz HH, et al. Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. *Blood* 1997;89:2291-2297.
 19. Mann RB, Jaffe ES, Berard CW. Malign lymphomas. A conceptual understanding of morphologic diversity. A review. *Am J Pathol*. 1979;94:105-191.
 20. Cleary ML, Trela MJ, Weiss LM, Warnke R, et al. Most null large cell lymphomas are B lineage neoplasms. *Lab Invest*. 1985;53:521-525.
 21. Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(6):995-1007.
 22. Lymphoma Study Group of Japanese Pathologists. The World Health Organization classification of malignant lymphomas in Japan: Incidence of recently recognized entities. *Pathol. Int*. 2000;50:696-702.
 23. Straus DJ, Filippa DA, Lieberman PH, Koziner B, et al. The non-Hodgkin's lymphomas. I. A retrospective clinical and pathologic analysis of 499 cases diagnosed between 1958 and 1969. *Cancer* 1983;51:101-109.
 24. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma: the Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997;89:3909-3918.

25. Salar A, Fernandez DS, Romagosa V, Domingo-Claros A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: is morphologic subdivision useful in clinical management? *Eur J Haematol.* 1998;60:202-208.
26. Chittal SM, Brousset P, Voigt JJ, Delsol G. Large B-cell lymphoma rich in T-cell and simulating Hodgkin's disease. *Histopathology* 1991;19:211-220.
27. Rudiger T, Ott G, Ott MM, Muller-Deubert SM, et al. Differential diagnosis between classic Hodgkin's lymphoma, T-cell-rich B-cell lymphoma, and paragranuloma by paraffin immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol.* 1998;22:1184-1191.
28. Fraga M, Garcia-Riviero A, Sanchez-Verde L, Forteza J, et al. T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma is a disseminated aggressive neoplasm: differential diagnosis from Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 2002;41:216-229.
29. Fleming MD, Shahsafaei A, Dorfman DM. Absence of dendritic reticulum cell staining is helpful for distinguishing T-cell-rich B-cell lymphoma from lymphocyte predominance Hodgkin's disease. *Appl Immunohistochem.* 1998;6:16-22.
30. Franke S, Wlodarska I, Maes B, Vandenberghe P, et al. Comparative genomic hybridization pattern distinguishes T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma from nodular lymphocyte predominance Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 2002;161:1861-1867.
31. Delsol G, Lamant L, Mariame BA. New subtype of large B-cell lymphoma expressing the ALK kinase and lacking the 2;5 translocation. *Blood* 1997;89:1483-1490.
32. Kinney MC, Glick AD, Stein H, Collins RD. Comparison of anaplastic large cell Ki-1 lymphomas and microvillous lymphomas in their immunologic and ultrastructural features. *Am J Surg Pathol.* 1990;14:1047-1060.
33. Rosai J. *Lymph Nodes.* Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Edinburg, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto. Mosby 2004: 1946-1950.
34. Weiss LM, Wood GS, Dorfman RNF. T-cell signet-ring cell lymphoma. A histologic, ultrastructural and immunohistochemical study of two cases. *Am J Surg Pathol.* 1985;9:273-280.
35. Ng CS, Chan JKC, Hui PK. Heterogeneity of interfollicular lymphomas. *Surg*

- Pathol 1991;4:372.
36. Weiss RL, Kjeldsberg CR, Colby TV, Marty J. Multilobated B-cell lymphomas. A study of 7 cases . Hematol Oncol 1985; 3: 79-86.
 37. Lasota J, Hyjek E, Koo CH, Blonski J et al. Cytokeratin-positive large-cell lymphomas of B-cell lineage: a study of five phenotypically unusual cases verified by polymerase chain reaction. Am J Surg Pathol 1997;20:346-354.
 38. Reed J.C: Cytochrome c: can't live with it- can't live without it. Cell 1997;91:559.
 39. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. N Engl J Med. 1993;329: 987-994.
 40. Foussard C, Desablens B, Sensebe L. GOELAMS Group, France. Is the International Prognostic Index for aggressive lymphomas useful for low grade lymphoma patients? Applicability to stage III-IV patients. Ann Oncol. 1997; 8: 49-52.
 41. Bosch F, Lopez-Guillermo A, Campo E. Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. Cancer. 1998; 82: 567-575.
 42. Ansell SM, Habermann TM, Kurtin PJ. Predictive capacity of the International Prognostic Factor Index in patients with peripheral T-cell lymphoma. J Clin Oncol. 1997;15: 2296-2301.
 43. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P. Follicular lymphoma international prognostic index. Blood. 2004;104:1258-1265.
 44. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100: 57-60.
 45. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature. 2000;403:503-511.
 46. Kerckaert JP, Deweindt C, Tilly H. LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas. Nat Genet 1993;5:66-70.
 47. Esteller M, Gaidano G, Goodman SN, Zagonel V, et al. Hypermethylation of the DNA repair gene O6-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. J. Natl. Cancer Inst 2002;94:26-32.
 48. Zhang A, Ohshima K, Sato K, Kanda M, et al. Prognostic clinicopathologic factors, including immunologic expression in diffuse large B-cell lymphomas.

- Pathol Int 1999;49:1043-1052.
49. Saez A, Sanchez E, Sanchez-Beato M. P27KIP1 is abnormally expressed in diffuse large B cell lymphomas and is associated with an adverse clinical outcome. *Br J. Cancer* 1999;80:1427-1434.
 50. Houldsworth J, Mathew S, Rao PH, Dyomina K, et al. REL proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood* 1996;87:25-29.
 51. Akasaka T, Akasaka H, Ueda C, Yonetani N et al. Molecular and clinical features of non-Burkitt's diffuse large cell lymphoma of B-cell type associated with the c-MYC immunoglobulin heavy chain fusion gene. *J Clin Oncol.* 2000;18:510-518.
 52. Gilles F, Goy A, Remache Y, Shue P, et al. MUC-1 dysregulation as the consequence of a t(1;14)(q21;q32) translocation in an extranodal lymphoma. *Blood* 2000;95:2930-2936.
 53. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90:244-251.
 54. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103:275-282.
 55. Barrans SL, Carter I, Owen RG, Davies FE, et al. Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the international prognostic index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2002;99:1136-1143.
 56. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, Rives S, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003;101:78-84.
 57. Lebien TW, McCormack RT. The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10): Emancipation from a functional enigma. *Blood* 1989;73:625-635.
 58. Ohshima K, Kawasaki C, Muta H. CD10 and Bcl 10 expression in diffuse large B-cell lymphoma :CD10 is a marker of improved prognosis. *Histopathology* 2001;39:156-162.
 59. Chang C, McClintock S, Cleveland RP, Trzpuć T, et al. Immunohistochemical

- expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 464-470.
60. Rossi D, Gaidano G. Molecular heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma: implications for disease management and prognosis. *Hematology*. 2002;7:239-252.
61. Natkunam Y, Warnke RA, Montgomery K, Falini B, et al. Analysis of MUM1/IRF4 protein expression using tissue microarrays and immunohistochemistry. *Mod Pathol* 2001;14 (7):686-694.
62. Graninger WB, Seto M, Boutain B, Goldman P, et al. Expression of Bcl-2 and Bcl-2-Ig fusion transcripts in normal and neoplastic cells. *J Clin Invest* 1987;80:1512.
63. Biasoli I, Morais JC, Scheliga A, Milito CB, et al. CD10 and bcl-2 expression combined with the international prognostic index can identify subgroups of patients with diffuse large-cell lymphoma with very good or very poor prognoses. *Histopathology* 2005;46:328-333.
64. Malign lymphomas, in Heim S, Mitelman F: *Cancer Cytogenetics*. New York, NY, Wiley-Liss, 1995, p 266.
65. Pan G, O'Rourke K, Dixit VM. Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem*. 1998;273(10):5841-5845.
66. Rao P.H, Houldsworth J, Dyonomina K. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998;92:234-240.
67. Monni O, Joensuu H, Franssila K, Klefstrom J, et al. BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1997;90:1168-1174.
68. Scholzen T. and Gerdes J. The Ki-67 protein. From the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182:311-322.
69. Sanchez E, Chacon I, Plaza MM, Munoz E, et al. Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. *J Clin Oncol* 1998;16:1931-1939.
70. Wun T, McKnight H, Tuscano JM. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) : a potential role in the pathogenesis of lymphoma. *Leuk Res* 2004;28: 179-190.
71. Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127:411-417.

72. Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol* 2002;190:279-286.
73. Kimura M, Osumi S, Ogihara M. Stimulation of DNA synthesis and proliferation by prostoglandins in primary cultures of adult rat hepatocytes *Eur J Pharmacol* 2000;404:259-271.
74. Hazar B, Ergin M, Seyrek E, Erdoğan Ş, et al. S. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2004;45 (7):1395-1399.
75. Steinbach G, Lynch PM, Phillips R. The effect of celecoxip a cyclooxygenase-2 inhibitor in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med.*2000;342:1946-1952.
76. Fosslien E, Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2000;37:431-502.
77. Tsuji M, Dubois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostoglandin endoperoxid synthase 2. *Cell* 1995;83:493-501.
78. Tsujii M, Kawano S, Dubois R.N.(1997) "Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential". *Proc Natl.Acad. Sci. USA.*94.3336-3340.
79. Sah NK, Khan Z, Khan GJ, Bisen PS. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Letters* 2006;1-8.
80. Kuttler F, Valnet-Rabier M-B, Angonin R, Ferrand C, et al. Relationship between expression of genes involved in cell cycle control and apoptosis in diffuse large B cell lymphoma: a preferential survivin-cyclin B link. *Leukemia* 2002; 16:726-735.
81. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, ed. Cellular Adaptations, Cell Injury, and Cell Death. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Philadelphia, Pennsylvania 2005:4-46.
82. Martinez A, Bellosillo B, Bosch F, Ferrer A, et al. Nuclear survivin expression in Mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival. *Am J Pathol* 2004;164:501-510.
83. Watanuki-Miyauchi R, Kojima Y, Tsurumi H, Hara T, et al. Expression of survivin and of antigen detected by a novel monoclonal antibody, T332, is associated with outcome of diffuse large B-cell lymphoma and its subtypes. *Pathol Int* 2005;55:324-330.

84. Gormley RP, Madan R, Dulau AE, Xu D, et al. Germinal center and activated B-cell profiles separate burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma in AIDS and non-AIDS cases. *Am J Clin Pathol* 2005;124:790-798.
85. Rosenwald A, Wright G, Chan WC. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med.*2002;346:1937-1947.
86. Wilson WH, Teruya-Feldstein J, Fest T, Haris C, et al. Relationship of p53, bcl-2 and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1997;89:601-609.
87. Jerkeman M, Anderson H, Dictor M, Kvaloy S, et al. Assessment of biological prognostic factors provides clinically relevant information in patient with diffuse large B-cell lymphoma- a Nordic Lymphoma Group study. *Ann Hematol* 2004;83: 414-419.
88. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Chan WG et al. Expression of PKC-beta or cyclin D2 predict for inferior survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 2005;18:1377-1384.
89. Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S. Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: A prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood* 1994;83:1460-1466.
90. Kawasaki C, Ohshim K, Suzumiya J. Rearrangements of bcl-1, bcl-2, bcl-6 and c-myc in diffuse large B-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2001;42:1099-1106.
91. Kramer MHH, Hermans J, Wijburg . Clinical relevance of bcl-2, bcl-6 and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998;92:3152-3162.
92. Hirose Y, Masaki Y, Karasawa H, Shimoyama K, et al. Incidence of diffuse large B-cell lymphoma of germinal center B-cell origin in whole diffuse large B-cell lymphoma: tissue fluorescence in situ hybridization using t(14;18) compared with immunohistochemistry. *Int J Hematol* 2005;81:48-57.
93. Kamihira S, Yamada Y, Hirakata Y. Aberrant expression of caspase cascade regulatory genes in adult T-cell leukemia: Survivin is an important determinant for prognosis. *Br J Haematol* 2001;114:63-69.
94. Tang SC, Visser L, Hepperle B, Hanson J, et al. Clinical significance of bcl-2-MBR gene rearrangement and protein expression in diffuse large-cell non-Hodgkin's lymphoma: an analysis of 83 cases. *J Clin Oncol* 1994;12:149-154.

95. Vitolo U, Gaidano G, Botto B. Rearrangements of bcl-6, bcl-2, c-myc and 6q deletion in B-diffuse large-cell lymphoma: clinical relevance in 71 patients. *Ann Oncol* 1998;9:55-61.
96. Lianos M, Alvarez-Arguelles H, Aleman R, Oramas J, et al. Prognostic significance of Ki-67 nuclear proliferative antigen, bcl-2 protein and p53 expression in follicular and diffuse large B-cell lymphoma. *Med Oncol* 2001;18:15-22.
97. Takeshita M, Iwashita A, Kurihara K. Histologic and immunohistologic findings and prognosis of 40 cases of gastric large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2000;24:1641-1649.
98. Garcia JF, Camacho FI, Morente M. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: Analyses using tissue microarrays. *Blood* 2003;101:681-689.
99. Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E et al. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large -cell lymphomas. *Blood* 2000; 96: 1921-1925.
100. Schlette EJ, Medeiros J, Goy A, Lai R, et al. Survivin expression predicts poorer in anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2004;22: 1682-1688.
101. Peterson C, Peterson S, Milas L. Enhancement of intrinsic tumor cell radiosensitivity induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Clin. Cancer Res* 2000;6:2513-2520.
102. Ericson BA, Longo WE, Panesar WE, Mazuski JE, et al. The effect of selective cyclooxygenase inhibitors on intestinal epithelial cell mitogenesis. *J Surg Res* 1999;81:101-7.
103. Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cell. *Cancer Res* 1998;58:4245-9.
104. Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, Tsujii M, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of gastric cancer xenografts via induction of apoptosis in nude mice. *Am J Physiol* 1998;274:G1061-7.
105. Phipps RP, Ryan E, Bernstein SH. Inhibition of cyclooxygenase-2: a new targeted therapy for B-cell lymphoma? *Leukemia Research* 2004;28:109-111.
106. Flick ED, Chan KA, Bracci PM, Holly EA. Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and non-Hodgkin lymphoma: a population-based case-

- control study. *Am J Epidemiol* 2006;164:497-504.
107. Lee AHS, Gillentt CE, Ryder K, Fentiman IS, et al. Different patterns of inflammation and prognosis in invasive carcinoma of the breast. *Histopathology* 2006;48:692-701.
108. Scholl S, Bieche I, Pallud C. Relevance of multiple biological parameters in breast cancer prognosis. *Breast* 1996;5:21-30.
109. Tomita N, Kodama F, Motomura S, Koharazawa H, et al. Prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma treated by risk-adopted therapy. *Intern Med* 2005;45.1549:247-252.