

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ NON-HODGKİN
LENFOMADA İMMÜNHİSTOKİMYASAL
OLARAK ALT GRUPLARIN
BELİRLENMESİNİN PROGNOZDAKİ ÖNEMİ**

İNCİ ALACACIOĞLU

HEMATOLOJİ UZMANLIK TEZİ

İZMİR –2007

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ NON-HODGKİN
LENFOMADA İMMÜNHİSTOKİMYASAL
OLARAK ALT GRUPLARIN
BELİRLENMESİNİN PROGNOZDAKİ ÖNEMİ**

HEMATOLOJİ UZMANLIK TEZİ

İNCİ ALACACIOĞLU

İÇİNDEKİLER :

A. ÖZET

TÜRKÇE	1
İNGİLİZCE.....	2

B. GİRİŞ VE AMAÇ.....3

C. GENEL BİLGİLER.....4

TANIM	4
PATOLOJİK SINIFLANDIRMA.....	5
PROGNOSTİK FAKTÖRLER.....	7
Klinik Heterojenite.....	7
Genetik ve biyolojik heterojenite.....	8
Gen Ekspresyon Profili.....	9
Bağışıklık sistemi ve Mikroçevre.....	10
İmmünohistokimyasal Teknikler.....	11

D. YÖNTEM VE GEREÇLER.....12

İmmünohistokimyasal Boyama:.....	12
İmmünohistokimyasal Değerlendirme.....	14
İstatistiksel Yöntemler.....	14

E. SONUÇLAR.....14

F. TARTIŞMA.....22

G. KAYNAKLAR.....27

TEŞEKKÜR

İç Hastalıkları ve Hematoloji uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve birikimleriyle bana yardımcı olan ve hoşgörülerini esirgemeyen başta sayın İç Hastalıkları Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Hale Akpınar ve Hematoloji Bilim Dalı başkanımız Prof Dr. Bülent Ünder olmak üzere tüm hocalarıma, tezimin fikirden başlayıp basım aşamasına kadar her aşamasında bana destek olan sayın Doç. Dr. Mehmet Ali Özcan'a, ayrıca tezimin hazırlanması döneminde katkı ve desteklerini gördüğüm Hematoloji Bilim dalı öğretim üyelerine, olguların patolojik preparatlarının bulunması ve değerlendirilmesinde yardımcı olan Patoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Aydanur Kargı, Doç Dr. Sermin Özkal, Dr. Ülkü Küçük ve tüm patoloji bilim dalı çalışanlarına, Hematoloji laboratuvar çalışanlarına teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca sevgi ve destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili aileme ve gerek tezimin her aşamasında, gerekse yaşamımın her anında her zaman bana destek olan biricik eşim Uzm. Dr. Ahmet Alacacıoğlu'na sonsuz teşekkürler...

Dr. İnci ALACACIOĞLU

Haziran 2007

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri

Tablo 2: İmmünohistokimyasal profiller ve TS-OS üzerine etkisi

Tablo 3: Grupların 2 yıllık ve 5 yıllık sağkalım oranları

Tablo 4: Multivariate analiz sonuçları

Tablo 5: Hans ve arkadaşları tarafından yapılan sınıflamaya göre olgularımızın dağılımı

RESİM LİSTESİ

Resim 1: GM, non-GM (ABH) ve sınıflandırılmayan olguların IPI skorlarına göre dağılımı

Resim 2: Tüm hastaların genel sağkalım grafiği

Resim 3: IPI (Düşük,orta-düşük/orta-yüksek,yüksek) skorunun TS üzerindeki etkisi

Resim 4: İmmünohistokimyasal sınıflandırmanın (GM, GM dışı, sınıflandırılmayan) TS üzerindeki etkisi

Resim 5: GM ve diğerleri (non-GM=ABH+sınıflandırılmayan)'nin TS üzerindeki etkisi

Resim 6: IPI'si düşük ve düşük-orta gruplar arasında genel sağkalım analizi

Resim 7: Düşük IPI'si olan hasta grubunda immünohistokimyasal sınıflandırmanın (GM x diğer (ABH+sınıflandırılmayan)) TS üzerine etkisi

Resim 8: Düşük IPI'si olan hasta grubunda GM x non-GM olarak sınıflamanın TS üzerine etkisi

A-ÖZET

Diffüz Büyük B hücreli non-Hodgkin lenfoma (DBBHL), klinik davranışı ve histomorfolojik özellikleri açısından oldukça heterojendir. Bu nedenle hastalığın seyrinin tahmin edilebilmesi ve buna uygun tedavi seçeneklerinin uygulanabilmesi için farklı prognostik faktörler araştırılmış ve bu yolda pek çok çalışmalar yapılmıştır. Son çalışmalarda DBBHL, DNA mikroarrayi kullanılarak gen ekspresyon profillerine göre prognostik önemi olan alt gruplara ayrılmıştır. Ancak bu yöntemin pahalı ve her yerde uygulanamıyor olması nedeni ile mevcut alt grupların immünohistokimyasal boyama yöntemleri ile karşılığının olup olmadığı araştırılmıştır. Literatür ışığında bu çalışmada da immünohistokimyasal olarak CD10, bcl-6, mum-1, bcl-2 boyanma paternlerine göre olguların prognostik alt gruplara sınıflandırılması ve bu sınıflamanın tüm sağkalım (TS), olaysız sağkalım (OS) üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Ocak 1990 ile Mayıs 2005 tarihleri arasında DBBHL tanısı olan olgular retrospektif olarak taranarak, verileri yeterli olan ve patolojik kesitlerine ulaşılabilen ardışık 50 olgu çalışmaya alındı. Kesitlerin CD10, bcl-6, mum1, bcl-2 boyanma paternlerine göre olgular, germinal merkez (GM) ve GM dışı (aktive B hücreli ve sınıflandırılmayan grup) olarak alt gruplara ayrıldı. %30'u GM, %70'i GM dışı B hücreli NHL olarak sınıflandırıldı. Erkek/Kadın oranı 29/21 olup, medyan yaşları 55,5'ti. Hasta grubu çoğunlukla uluslararası prognostik indeksi (IPI) düşük ve orta-düşük risk grubundan oluşuyordu (41 olgu). IPI'nin TS ve OS üzerinde etkisi istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.0001$, $p=0.01$). IPI'ye göre düşük ve orta-düşük risk grubunda yer alan olguların sağkalımları daha uzundu.

Protein ekspresyonlarının TS üzerinde bireysel etkilerine bakıldığında CD10 pozitif olgularda sağkalımın daha uzun, mum1 pozitif olgularda ise daha kısa olduğu, bcl-6 ve bcl-2'nin anlamlı etkisinin bulunmadığı görüldü. Olgular sınıflandırıldığında ise literatür ile uyumlu olarak TS ve OS'nin GM hücreli DBBHL'da anlamlı ölçüde uzun olduğu saptandı ($p=0.002$, $p=0.04$). Literatürde 5 yıllık sağkalım oranının GM olgularında %76, GM dışı olgularda %34 olduğu ($p=0.001$) ve bulguların cDNA mikroarray kullanılarak elde edilen sonuçlar ile benzer olduğu vurgulanmıştı. Bizim çalışmamızda da literatüre benzer olarak GM olgularında 5 yıllık sağkalım oranı %92, GM dışı olgularda %40 olup GM olgularının sağkalım oranı anlamlı ölçüde yüksekti ($p=0.02$).

Sonuç olarak, DBBHL'da GM ve GM dışı şeklindeki immünohistokimyasal sınıflama daha gerçekçi bir prognostik bilgi sağlayabilir. IPI düşük risk grubunda dahi GM ve GM dışı olgular arasında sağkalım farkının olması, tedavilerin seçiminde prognostik sınıflamanın önemini vurgulamaktadır.

SUMMARY

Diffuse large B-cell Lymphoma (DLBCL) is heterogenous both clinically and morphologically. Because of this heterogeneity, the different prognostic factors had been studied to be able to identify at diagnosis those patients who may benefit from more aggressive or experimental therapies. Currently, using a cDNA microarray, DLBCL can be divided into prognostically significant subgroups. Because this technology is expensive and not generally available, immunohistochemistry had been studied to subclassify DLBCL into prognostically significant groups. The aim of this study was to evaluate the use of immunoperoxidase staining for CD10, bcl-6, mum-1 and bcl-2 to subdivide DLBCL into prognostic subgroups and to examine the effect of this classification on overall survival rate (OS) and event free survival rate (EFS).

Fifty consecutive patients with DLBCL diagnosed between January 1990 and May 2005 in our clinic were evaluated retrospectively. The M/F was 29/21 with the median age of 55,5 years. They were classified as germinal center B-cell-like (GCB) (30%), non-GCB (70%) [activated B-cell-like (ABC) (54%) and unclassified group (16%)] according to CD10, bcl-6, mum-1 and bcl-2 staining pattern. The patient group mostly consisted of the patients with low and low-intermediate IPI (41 cases). IPI was found to be significantly predictive for OS and EFS ($p=0.0001$, $p=0.01$). The patients with low and low-intermediate IPI lived longer.

When the protein expressions were studied individually, OS of the patients with CD10 positivity was found to be longer but OS of the patients with mum-1 positivity was found to be shorter. There were no significant effect of bcl-6 or bcl-2 on OS. The cases classified as GCB by immunohistochemistry had a significantly longer OS and EFS compatible with literature ($p=0.002$, $p=0.04$). In the literature, the 5-year OS for GCB group was 76%, compared with 34% for the non-GCB group ($p=0.001$) which was similar to that reported using the cDNA microarray. In our study, the 5-year OS for GCB group was 92%, compared with 40% for the non-GCB group ($p=0.02$).

The existence of survival differences between GCB and non-GCB groups also in the patients with low IPI score showed the importance of prognostic classification in the risk-adaptive treatment approaches. In conclusion, the classification as GCB and non-GCB phenotype based immunostains may enable to define more accurate prognostic groups in DLBCL.

B-GİRİŞ VE AMAÇ

Diffüz Büyük B hücreli non-Hodgkin lenfoma (DBBHL) erişkinlerde en sık görülen lenfoid neoplazi olup, her yıl yaklaşık dünyada 30.000 yeni olgu tanı almaktadır. Tüm non-Hodgkin lenfomaların (NHL) %40'ını DBBHL oluşturmaktadır (1). Gerek klinik davranışı, gerekse histomorfolojik özellikleri açısından oldukça heterojen olup, bu özellikleri ile diğer lenfoma tiplerinden ayrılmaktadır (Mantle hücreli lenfoma, küçük lenfositik lenfoma, Burkitt lenfoma) (2,3). Antrasikline dayalı kemoterapilerin kullanılmasına rağmen sürekli remisyona, hastaların ancak %40-50'sinde elde edilebilmektedir (4). Bu nedenle teşhis anında, daha saldırgan ya da deneysel tedavilerden fayda görebilecek hastaların belirlenmesi büyük önem kazanmaktadır. Bu amaçla 'International Prognostic Index=IPI' skorlama sistemi geliştirilmiştir (3).

Histomorfolojik olarak DBBHL'nın anaplastik, sentroblastik, immünoblastik ve T hücreden zengin histiyositik B hücreli NHL olarak çeşitli varyantları mevcuttur. Fakat son lenfoma sınıflama sistemlerinde bu histomorfolojik varyantların hiçbirisinin ayrı olarak prognostik bir önemi saptanamamıştır (5,6).

Alizadeh ve arkadaşları cDNA mikroarrayi kullanarak yaptıkları çalışmalarında, DBBHL olgularında gen ekspresyon profilleri germinal merkez (GM) B hücrelerine benzeyenlerin prognozlarının, gen ekspresyon profilleri aktive B hücrelerine benzeyenlerden (AB) daha iyi olduğunu ortaya koymuşlardır (7). Bir başka çalışmada gen ekspresyon profillerinin kemoterapi sonrası DBBHL hastalarının prognozlarının tayininde önemli olduğu vurgulanmıştır (8). Fakat gen ekspresyon profillerinin çalışılması günümüz koşullarında çok pratik olmayıp, aynı zamanda pahalı bir tetkik olmasından dolayı DBBHL'nın patolojik olarak GM orijinli veya aktive B hücre orijinli olarak ayırabilecek immünohistokimyasal belirteçler araştırılmıştır. Ayrıca bu belirteçlerin cDNA mikroarray gen ekspresyon çalışmaları gibi prognostik bir önem taşıyıp taşımadığı henüz tam net değildir. Verilerin daha fazla çalışma ile desteklenmesi gerektiğini ve hatta her geçen gün yenisi eklenen yeni antikolar ile geliştirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Biz de tüm bu çalışmaları göz önüne alarak immünohistokimyasal olarak CD10, bcl-6, mum-1, bcl-2 boyanma paternlerine göre olguları prognostik alt gruplara ayırmayı ve bu ayrımın OS, EFS üzerine olan etkilerini incelemeyi amaçladık

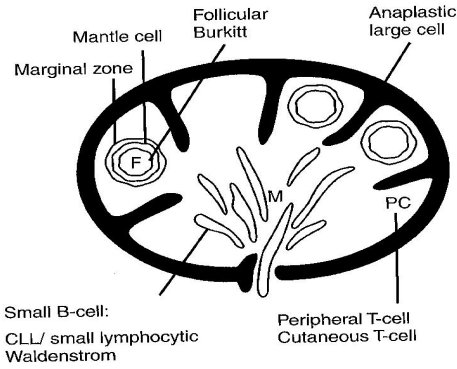
C-GENEL BİLGİLER

TANIM

Hodgkin dışı lenfoma (NHL), klasik Hodgkin hastalığı hariç lenfoid sistemden köken alan tüm malignansileri kapsar. Ancak lenfoid sistem oldukça kompleks olup, bu sisteme ait hücreler lenf düğümlerinde yerleştikleri gibi, sinir sistemi ve mide hariç vücut içerisindeki her organda bulunurlar. Bu sistemde başlıca üç tip hücre bulunur: Doğal öldürücü (Naturel killer=NK) hücreler, B hücreleri, T hücreleri. Hücrelerin çoğalma, olgunlaşma, karşılaştıkları antijene spesifik olarak seçilme özellikleri mevcuttur. Her hücre tipi de, olgunlaşma sürecinin herhangi bir basamağında klonojenik olarak anormal çoğalabilir. Bu nedenle NHL'nın farklı davranış sergileyen, farklı alt tiplerinin olması hastalığın doğası gereğidir (9).

Morfolojik olarak yapılan değerlendirme, mikroskopik olarak küçük büyütme alanında dokunun yapısının ve infiltrasyon paterninin değerlendirilmesine dayanır. Büyük büyütme alanı ile de sitolojik özellikleri belirlenir (küçük çentikli=sentrositler, büyük transforme =sentroblast ya da immünoblast, plazmasitoid lenfositler ya da plazma hücreleri) (10).

B hücreli lenfomalar / T hücreli lenfomalar



Lenfomalar lenf düğümünün normal yapısını kısmi ya da tam olarak bozabilirler. Büyüme paternleri sıklıkla nodüler ya da diffüz olarak tanımlanır.

Lenf düğümünün özel anatomik bölmeleri içinden köken alırlar ve buna göre adlandırılırlar (follikül=germinal merkez, follikül mantle veya parakortikal ve medüller alanlar) (şekil 1).

Şekil 1: Lenf düğümleri içinde lenfomaların köken aldıkları bölgeler (10).

Klinisyene yardımcı olabilmek için yıllar içinde pek çok farklı sınıflama sistemleri geliştirilmiş ve bu çeşitlilik kafa karıştırıcı olmuştur. Patolojik sınıflandırmaya özellikle DBBHL'nın sınıflamalar içindeki yerine aşağıda değinilecektir.

PATOLOJİK SINIFLANDIRMA

Lenfoma tedavilerini düzenleyebilmek için sınıflandırmaya ihtiyaç duyulmuş ve zaman içerisinde pek çok sınıflama sistemi geliştirilmiştir. Rappaport ve diğerleri tarafından ilk geliştirilen sistemler morfolojiye dayandırılmıştır (11). Lenfoma biyolojisine yönelik bilgiler arttıkça sınıflama sistemleri güncellenmiştir. 1974'te Kiel ve Lukes-Collins sınıflaması (11), 1982'de Working Formülasyonu (Working Formulation) (WF) geliştirilmiştir (12). WF lenfomayı hücre büyüklüğü, nodal yapı ve morfolojiye göre sınıflandırmış, yaşam süresine karşılık gelecek şekilde düşük-orta-yüksek derece olarak derecelendirmiştir. WF kolay uygulanabilir ve prognostik olarak kullanışlı olmasına rağmen, Kiel ve Lukes-Collins'in bazı biyolojik içerikleri açısından eksiktir.

B hücre maligniteleri	T-hücreli ve NK hücreli maligniteler
Prekürsör B-hücre M. Prekürsör B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	Prekürsör T hücre M. Prekürsör B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
Olgun B-hücre M. Kronik lenfositik lösemi/küçük lenfositik lenfoma B-hücre prolenfositik lösemi Lenfoplazmasitik lenfoma Splenik marjinal zon B-hücreli lenfoma Saçlı hücreli lösemi Plazma hücreli myeloma Önemi bilinmeyen monoklonal gammopati Kemiğin soliter plazmasitomu Ekstraosseöz plazmasitomu Primer amiloidoz Ağır zincir hastalıkları Mukoza ilişkili lenfoid dokunun ektranodal marjinal zon B-hücre lenfoması Nodal marjinal zon B-hücre lenfoması Foliküler lenfoma Mantle hücreli lenfoma DBBHL Mediastinal (timik) büyük B-hücreli lenfoma İntravasküler büyük B-hücreli lenfoma Primer effüzyon lenfoması Burkitt lenfoma/lösemi	Olgun T-hücre ve NK hücreli M. T-hücreli prolenfositik lösemi T-hücreli büyük granüler lenfositik lösemi Agresif NK-hücreli lösemi Erişkin T-hücreli lösemi/lenfoması Ekstranodal NK/T-hücreli lenfoma,nazal tip Enteropati tip T-hücreli lenfoma Hepatosplenik T-hücreli lenfoma Subkutan pannikülit benzeri T-hücreli lenfoma Mikozis fungoides Sezari sendromu Primer kutanöz anaplastik büyük hücreli lenfoma Anaplastik büyük hücreli lenfoma Anjiyoimmünoblastik T-hücreli lenfoma Periferik T-hücreli lenfoma, spesifiye edilemeyen
Malign potansiyeli bilinmeyen B hücre artışı Lenfomatoid granülopatosis Posttransplant lenfoproliferatif bozukluk, polimorfik	Malign potansiyeli bilinmeyen T hücre artışı Lenfomatoid papülozis Kesin olmayan olgunlaşma evresinin veya dizisinin malignitesi Blastik NK-hücreli lenfoma

Tablo 1: NHL dahil lenfoproliferatif bozuklukların WHO'ya göre sınıflandırılması (referans 10'dan alınarak düzenlenmiştir)

Revize Avrupa-Amerikan lenfoma sınıflama sistemi (Revised European-American Lymphoma classification) (REAL) 1994'te yayınlanmış ve genetik, immünotipleme, lenfosit gelişimi ve lenfoid seri üzerine kurulmuştur (6). REAL sınıflaması da 2001'de Dünya Sağlık Örgütü sınıflaması olarak (World Health Organization=WHO) güncellenmiştir (5) (Tablo 1). DBBHL tanımlaması 2001 WHO'ya kadar farklı tanımlamalar almıştır (Tablo2).

Rappaport (1996)	Diffüz Histiositik Lenfoma
Kiel (1974)	Sentroblastik Lenfoma B-immünotblastik Lenfoma B-büyük hücreli anaplastik lenfoma
Lukes-Collins (1974)	Büyük çentikli folliküler merkez hücreli lenfoma Büyük çentiksiz folliküler merkez hücreli lenfoma B-immünotblastik lenfoma
WF (1982)	Diffüz miks küçük ve büyük hücreli lenfoma (grup F) Diffüz büyük hücreli lenfoma (grupG) Büyük hücreli immünotblastik lenfoma
REAL (1994) ve WHO (2001)	Diffüz büyük B-hücreli lenfoma

Tablo 2: NHL patolojik sınıflama sistemleri içinde DBBHL'nin yeri

REAL sınıflaması 2001'de WHO olarak güncellenmesine rağmen DBBHL tanısı değiştirilmemiştir (5).

DBBHL'da malign B lenfositleri lenf düğümünün normal yapısını ya da lenf düğümü dışındaki bir bölgeyi yaygın olarak infiltre ettikleri için bu şekilde tanımlanmıştır. Hücreler büyük transforme lenfositler olup ileri morfolojik varyantlarına ayrılırlar (5,6):

- a) Sentroblastik
- b) İmmünotblastik
- c) T-hücreli/histiyositten zengin
- d) Anaplastik

DBBHL hücreleri tipik olarak pan-B hücre belirteçleri olan CD19, CD20, CD22, CD79a ve sıklıkla (%50-75) yüzey immünglobulinleri ekspres ederler (5,6). CD30 ekspresyonu sıklıkla anaplastik varyantı ile birliktelik gösterir. Çok az bir kısmı da CD10 ya da CD5 ekspres edebilirler. Bunlar cyclin D1 (-) olmakla da blastik mantle hücreli lenfomadan ayrılırlar (5).

PROGNOSTİK FAKTÖRLER

NHL'lı hastalarda histolojik tip prognozu etkileyen başlıca etmendir. Fakat hastalık histolojisinden başka faktörler ve tedavi de hastaların bireysel olarak prognozunu etkilemektedir. Günümüzde hastalığın bireylerde nasıl seyredeceğini bilmek ve buna yönelik optimal tedavileri bulmak önem kazanmıştır. Bu amaca yönelik pek çok klinik ve deneysel çalışmalar düzenlenmiş ve düzenlenmektedir. NHL'nın bu konuda en fazla çalışma yapılan alt tipi DBBHL'dır (9).

Klinik heterojenite:

DBBHL hastalarının bir kısmında standart kemoterapilerle kür elde edilebilirken, büyük bir kısmı da hastalık nedeni ile ölmektedir. Antrasiklin içeren kemoterapilerden sonra relaps riski yüksek hasta grubunu tanımlayabilmek için klinik modeller geliştirilmiştir. IPI bu modellerden biridir. Standart doksorubisin içeren kemoterapi alan çok büyük hasta topluluğunun verilerinden sentezlenmiştir. Başlıca beş parametre üzerine kurulmuştur. Her bir parametreye bir puan verilmiştir:

1. Yaş >60
2. Performans skoru (Eastern Cooperative Oncology Group=ECOG) ≥ 2
3. Yüksek LDH değeri
4. Ekstra-nodal tutulum sayısı ≥ 2
5. Ann Arbor evre III-IV

İçerdikleri kötü prognostik faktör sayısına göre dört risk grubuna ayrılmıştır: IPI düşük risk grubu: 0-1, IPI orta-düşük risk grubu: 2, IPI orta-yüksek risk grubu:3, IPI yüksek risk grubu:4-5 (13). IPI'nin kullanımında başlıca sınırlayıcı faktör hastaların yarısının orta risk grubuna düşüyor olmasıdır. Bu grupta terapötik kararlar halen kolay verilememektedir.

Diğer indeks, 'tümör skoru' adı altında M.D. Anderson Kanseri Merkezi'nde geliştirilmiştir:

1. Konstitüsyonel semptomların varlığı
2. Evre III-IV
3. Tümör kitlesi >7cm
4. LDH > normalin 1.1 katı
5. $\beta 2$ -mikroglobulin > normal seviyenin 1.5 katı

Beş faktörden >3 faktörün pozitif olduğu grup yüksek risk grubu olarak sınıflandırılmış, CHOP-bleomisin ile tedavi edildiklerinde prognozun kötü olacağı, araştırma protokollerine dahil edilmeleri gerektiği vurgulanmıştır (14).

Genetik ve biyolojik heterojenite

DBBHL'nın lenf dögümleri ya da sekonder lenfoid organların germinal merkezlerine göç eden, antijenik uyarıya maruz kalmış normal B hücrelerinden köken aldığı düşünülmektedir. Germinal merkezde B lenfositlerin gelişimi süresince immünglobulin değışken bölge (IgV) genlerinde somatik hipermutasyon oluşmakta ve mutasyon olgunlaşma sürecinin bu basamağında belirteç görevi görmektedir (15). Somatik hipermutasyon antikor çeşitliliğine neden olmakta, antijene eğilimi arttırmakta ve aynı zamanda kromozomal translokasyonların oluşumu için zemin yaratmaktadır (15).

DBBHL'da pek çok genetik anormallikler tanımlanmıştır. Olguların yaklaşık %50'sinde tekrarlayan kromozomal translokasyonlar (16), %67'sinde DNA dengesizlikleri yer almaktadır (17). En sık görülen 3 düzensiz gen; bcl-6, bcl-2 ve cMyc, aynı mekanizma ile oluşmuşlardır.

BCL-6

DBBHL'da 3q27 bandı üzerindeki bcl-6 genini içeren kromozomal translokasyon en sık görülen genetik anomalidir (%35-40) (18). Bcl-6 normalde GM hücrelerinde yaygın olarak eksprese olup, GM içinde oldukça kritik bir rolü olduğu düşünülmektedir. Bcl-6 (-) hayvanlarda antijenik uyarıya yanıt olarak GM oluşumunda yetersizlik olduğu görülmüştür (19). Bcl-6'nın düşük oranda eksprese edilmesi normal GM B hücrelerinin hafıza B hücrelerine ya da plazma hücrelerine dönüşümü için gerekli olabilir. Fakat DBBHL'da düzensiz bcl-6 ekspresyonu hücrelerin olgunlaşma evresinde durmasına ve proliferatif avantaj kazanmalarına neden olabilmektedir.

Son çalışmalarda bcl-6'nın p53 üzerinde negatif regülasyon ile lenfomagenезisi ve GM oluşumunu regüle edebileceği gösterilmiştir (20).

BCL-2

18q21 bandı üzerinde yerleşmiş bir proto-onkogen olup, apoptozisi inhibe eder ve kemoterapi direncinden sorumludur (21).

Bcl-2 ekspresyonu negatif B-hücre seleksiyonunda apoptozisin kritik bir rol oynadığı GM'de normalde düşük orandadır. Bcl-2'de oluşabilecek bozuk regülasyon sıklıkla t(14;18) ile birliktelik gösterir ve DBBHL'nın yaklaşık %15'inde mevcuttur (22,23). Fakat t(14;18)'den bağımsız olarak ta bcl-2 DBBHL'da %50 oranında eksprese edilmektedir (22). t(14;18) tek başına prediktif bir değer taşımamakla birlikte, artan bcl-2 protein ekspresyonu, DBBHL'da kötü prognostik özellik taşımaktadır (22).

cMYC

Burkitt lenfoma ile birliktelik gösteren bir transkripsiyon faktörü olmakla birlikte DBBHL'ların %15'inde regülasyonu bozulmuştur (23). Yaşam süresi üzerine net etkisi gösterilememiştir (23,24).

FAS (CD95)

GM hücreleri tarafından eksprese edilen pro-apoptotik bir proteindir. Negatif B hücre seleksiyonundan sorumludur. FAS mutasyonları DBBHL'ın yaklaşık %20'sinde görülmekte ve sıklıkla ölüm domainini kodlayan son eksonda oluşmaktadır (25). FAS kaybı otoimmün hastalıkların ortaya çıkması ve malign klonların sebat etmesi ile sonuçlanmaktadır (B hücre lenfomaları, otoimmün lenfoproliferatif sendrom) (25,26,27).

Aberran Somatik Hipermutasyon (SHM)

Somatik hipermutasyon varlığı DBBHL'nın GM ya da post-GM B hücrelerinden köken aldığını gösterir (28).

p53

p53 tümör supresör gen mutasyonu kötü prognoz ile birliktelik gösterir. p53, kromozom 17p'nin üzerinde bulunur ve kaybı kötü prognoz ile ilişkilidir (29).

Kromozomal dengesizlikler

DBBHL'da prognozu etkileyebilen çeşitli kromozomal dengesizlikler bulunmuştur (17). Kromozom 1q (30), 5 (31),7q (32) ve 14 (33) ile ilgili bozukluklar kötü prognoz ile ilişkilirken, 3p (33) kromozomu iyi prognoz ile ilişkilidir.

Gen Ekspresyon Profili

DBBHL'da klinik ve genetik heterojenite varlığı ek araştırmalar yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur. Son yıllara kadar, biyolojik heterojenite analizleri genler (tedaviye yanıt, diğer maligniteler ve normal lenfosit gelişimi ile birliktelik gösteren) üzerinde yoğunlaşmıştır (34). Mikroarray teknoloji lenfoma biyolojisine yönelik çalışmalarda güçlü ve heyecan verici yeni araçlar sağlamaktadır. DNA ya da oligonükleotid mikroarrayler kullanılarak genlerin aktivitesi ve moleküler yollar değerlendirilebilmektedir. Bu da hastalığın patolojisinde kritik roller oynayabilen moleküler yolların ve genlerin

tanımlanmasını, DBBHL'nın heterojenitesinin çalışılmasını, biyolojik karakteristik özelliklerine dayalı yeni sınıflandırma sistemlerinin geliştirilmesini sağlamaktadır (7,8,35,36).

Gen ekspresyon profili çalışmaları DBBHL'yı gen ekspresyonundaki benzerliklere göre alt gruplara ayırmıştır. Bu çalışmalardan birinde Alizadeh ve arkadaşları gen ekspresyon paternlerine göre DBBHL'yı germinal merkez (GM) B hücreli ve aktive periferel kan B (AB) hücreli olarak iki alt gruba ayırmışlardır. Bu ayırım aynı zamanda hücre orijinlerini de yansıtmaktadır (GM x post germinal merkez/periferel kan). Çalışmada GM B hücreli DBBHL'nın 5 yıllık sağkalım oranının diğer alt gruba göre üstün olduğu görülmüştür (%76 x %16) (7).

Literatürde GM alt tipinde CD 10, BCL-6, ve LMO2 (anjyogenezde ve B hücre farklılaşmasının inhibisyonunda rol oynayan) (7,37) gibi başka genler tanımlanmıştır. Diğer bir çalışmada BCL-6 ve LMO2 sağkalımda etkili bulunmuşlardır (37). AB hücreli alt grupta tanımlayıcı genler de IRF4/MUM1, FLIP ve BCL-2 olarak bulunmuştur (7). IRF4 (interferon regulatuar faktör 4) MUM1 (multiple myeloma onkogeni 1) olarak ta bilinir ve B hücrelerinin GM'den plazma hücrelerine doğru farklılaşmasının son basamağında transkripsiyon faktörü olarak rol alır (38,39). DBBHL'nın %50'sinde hücrelerin post-germinal gelişim evresinin göstergesidir (38). FLIP (FLICE benzeri inhibitör protein) kaspaz 8'in apoptotik aktivitesini bloke eder (40). AB hücreli DBBHL alt grubunda eksprese olan diğer iki gen ise cyclin D2 ve SCYA3'tür. BCL-2 ile birlikte üçü bir çalışmada kötü prognostik faktör olarak bildirilmiştir (37).

Bu çalışmaları tamamlayıcı olarak yapılan başka bir çalışma 240 kişilik büyük bir DBBHL grubunda yapılmıştır. Burada ek olarak tip 3 adı ile yeni bir alt grup ortaya atılmıştır. Bu yeni grup GM veya AB hücreli alt tiplerin gen özelliklerinin çok azını eksprese etmektedir. 5 yıllık sağkalım hızı %39 olup AB hücreli grup ile benzerdir (%35) (8). Ancak bu grup oldukça heterojen gibi görünmektedir. Ancak sonrasında gen ekspresyon verilerini farklı bir yaklaşım ile analiz eden (Bayesian metodu) çalışmada tip 3 grubu ya GM ya da AB hücreli DBBHL alt gruplarına dahil edilmiştir (41).

Bağışıklık sistemi ve Mikroçevre

DBBHL'da bağışıklık sisteminin yanıtı üzerine yapılan çalışmalarda konakçı yanıtının önemi vurgulanmıştır (8).

Bağışıklık sisteminin yanıtının göstergesi olabilecek T hücre infiltrasyonunun sağkalım ve tümör kontrolü üzerine olumlu katkısı olabileceği gösterilmiştir (42).

İmmünohistokimyasal Teknikler

Gen ekspresyon profili teknolojisi prognostik açıdan güçlü bir teknik olmasına rağmen klinik açıdan uygulanabilirliği kolay değildir. Bu nedenle bu tekniğin gücüne ulaşabilecek başka yöntemler araştırılmıştır. Son yıllarda immünohistokimyasal tekniklerin bu konuda önemini vurgulayan çalışmalar yapılmıştır. CD10, bcl-6, mum-1 ve bazen CD138, gen teknolojisi ile ayrılan iki alt grubu ayırmak için kullanılmıştır (38,43).

Hans CP ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada gen ekspresyon profiline göre ve immünohistokimyasal olarak yapılan sınıflandırmalar karşılaştırılmıştır. Burada CD10 +/-, bcl-6 +, MUM 1- olan grup GM, diğerleri ise GM dışı (non-GM) olarak adlandırılmıştır. Gruplar arasında sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (%76 x %34 p<0.001)(38). İlginç olarak immünohistokimyasal olguların sınıflandırılmasının klinik ile DNA mikroarray teknolojisinden daha ilişkili olduğu görülmüştür. Örneğin, immünohistokimyasal olarak GM hücreli DBBHL grubuna alınan 8 olgunun DNA mikroarray tekniği ile AB hücreli olduğu ve bu olguların 5 yıllık sağkalım oranlarının (%76) üstün olduğu tesbit edilmiştir (38). Yine immünohistokimyasal olarak AB hücreli DBBHL grubuna alınan 22 olgunun DNA mikroarray tekniğine göre GM grubuna alındığı fakat sağkalım oranının %34 olduğu tesbit edilmiştir (38).

D-GEREÇ ve YÖNTEMLER:

Ocak 1990 ile Mayıs 2005 tarihleri arasındaki Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvurmuş tüm DBBHL tanısı olan olgular retrospektif olarak taranarak, verileri yeterli olan ve patolojik kesitlerine ulaşılabilen 50 olgu çalışmaya alındı. Hastaların sağkalım bilgileri, Nisan 2006'da hastalara telefon edilerek güncelleştirildi.

Olgular ile ilgili tüm veriler [hemogram, karaciğer fonksiyon testleri, böbrek fonksiyon testleri, laktat dehidrogenaz (LDH), eritrosit sedimentasyon hızı (ESR), tanı tarihleri, aldıkları tedaviler, tedaviye yanıtları, relaps zamanları, relaps sonrası aldıkları tedaviler, ölüm tarihleri] Microsoft Excel ve SPSS 11.0 programına kaydedildi.

Hastaların tedaviye olan yanıtları Cheson ve arkadaşlarının NHL'de yanıt kriterlerini standardize etmek için düzenledikleri çalışma grubunun raporuna göre düzenlendi (44).

Hastaların biyopsi materyallerinin tekrar değerlendirilmesi ve immünohistokimyasal boyamanın yapılması için Patoloji Bölümü ile görüşülerek onay alındı.

İmmünohistokimyasal boyama:

Olgulara ait kesitlere CD20 (MS-340-R7, Neomarker) proteinine karşı geliştirilmiş primer poliklonal antikorlar uygulanarak DBBHL tanısı doğrulandıktan sonra, CD10 (MS-728-R7, Neomarker), bcl-6 (M7211, Dako Cytomation) ve mum-1 (M7259, Dako Cytomation) proteinine karşı geliştirilmiş primer poliklonal antikorları uygulandı

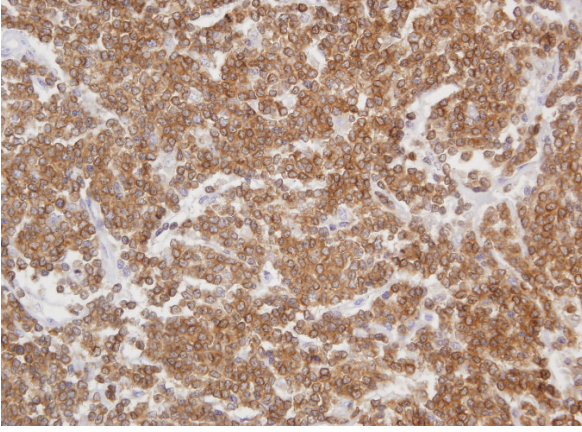
Daha sonra bu gruplarda bcl-2 (M0887, Dako, Cytomation), proteinine karşı geliştirilmiş primer poliklonal antikor kullanılarak streptavidin-biotin-immunperoksidaz yöntemiyle ekspresyonları değerlendirildi.

Hazırlanan kesitler 20 dakika ksilolde bekletilerek deparafinize edildi ve inen alkol serilerinden (%96, %90, %80, %70) geçirilerek yeniden hidrate edildi. Daha sonra %3'lük H₂O₂'de 15 dakika uygulanarak endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. CD20 antikoruna için kaynatma yapılmadan antikorlar uygulandı. CD 10, mum-1 antikoruna uygulananlar sitrat buffer solüsyonunda (0,01ml/l, pH=6) mikrodalga fırında 3 kez beşer dakika kaynatılarak antijenin açığa çıkması sağlandı. Bcl-2; pH=9 EDTA buffer solüsyonunda 20 dakika kaynatılırken, bcl-6 pH =8 EDTA buffer solüsyonunda 36 dakika, CD 10 ise 30 dakika kaynatıldı.

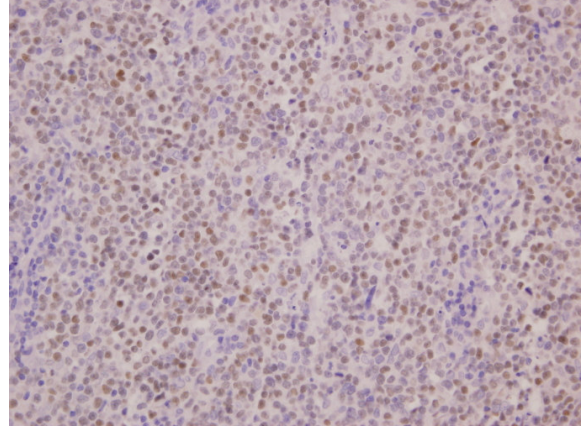
Kesitler 15-20 dakika süreyle oda ısısında soğumaya bırakıldı. Daha sonra kesitler aşağıdaki basamaklardan geçirildi:

1. Kesitlere CD20, bcl-6 (Dilüsyon:1/20), CD10 (Dilüsyon:1/40), mum-1 (Dilüsyon:1/50), bcl-2 (Dilüsyon:1/100), primer antikorları damlatılarak oda ısısında 1 saat bekletildi.
2. Tris solüsyonunda (PH=7,2) 5 dakika yıkandı.
3. Biotinize antikordan damlatıldı ve 15 dakika bekletildi.
4. Tris solüsyonu 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 hematoksilin 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.

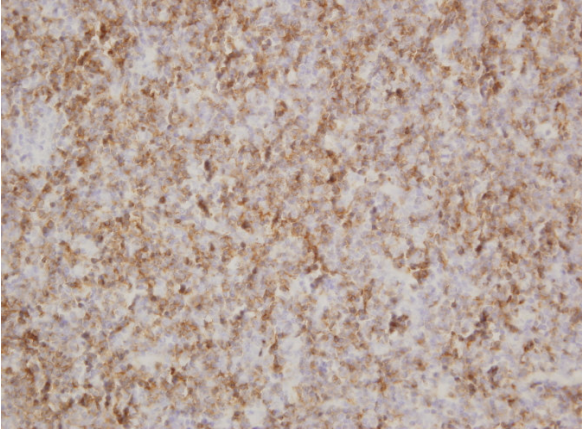
bcl2



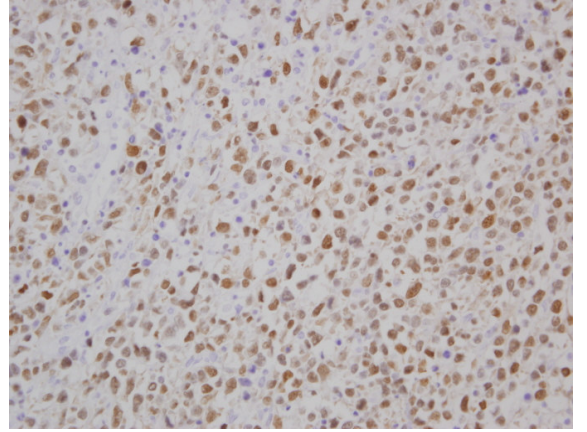
bcl6



CD10



mum1



İmmünohistokimyasal değerlendirme:

İmmünohistokimyasal boyamalar yukarıda belirtildiği üzere yapılarak, bağımsız iki Patolog tarafından değerlendirildi. Kesitlere CD 10, bcl-6, mum-1 ve bcl-2 monoklonal antikorları uygulandı. CD10 kahverengi sitoplazmik boyanma, bcl-6 nükleer boyanma, mum-1 nükleer/sitoplazmik boyanma, bcl-2 kahverengi sitoplazmik boyanma gösterdi. Pozitif kontrol olarak, CD10 için böbrek dokusu, bcl-6, bcl-2 ve mum-1 için tonsil dokusu kullanıldı. Literatürler göz önüne alınarak, tümör hücrelerinin %20'sinden fazlasında protein tesbit edildiğinde CD 10, bcl-6, mum-1 ekspresyonu pozitif olarak kabul edilirken (45,46), bcl-2 için %30 ve üstünde hücrelerin boyanması pozitif olarak kabul edildi (38).

Böylece olgular GM (CD10 ve/veya bcl-6 olumlu, mum-1 olumsuz), non-GM (Aktive B hücreli=ABH) (CD10 ve/veya bcl-6 olumsuz, mum-1 olumlu) ve her üç antikorla da boyanması olmayan olgular spesifiye edilemeyen (sınıflandırılmayan) olmak üzere 3 grup oluşturuldu. Ayrıca, sınıflandırılmayan üçüncü grup Hans ve arkadaşlarının sınıflandırması da göz önüne alınarak ikinci gruba (ABH) dahil edildi. Böylece olgular GM ve GM dışı olmak üzere de ele alınarak istatistiksel analizleri yapıldı.

İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER:

Tüm istatistiksel analizler SPSS 11.0 programı kullanılarak yapıldı. Sayısal parametreler ortanca (medyan, median), ortalama (mean), aralık (range) olarak özetlendi. Kategorik değişkenler frekans olarak belirtildi. Tüm sağkalım (TS), olaysız sağkalım (OS) dağılımlarını tahmin etmek için Kaplan-Meier metodu kullanıldı. Teşhis tarihi ile ölüm tarihi (herhangi bir nedene bağlı) veya son ulaşım tarihi arasındaki zaman TS, teşhis tarihi ile progrese olduğu ya da tekrar ettiği zamana kadar geçen zaman OS olarak kaydedildi. Sağkalımı etkileyen faktörlerden prognozu etkileyen en önemli faktörü belirlemek için cox regresyon testi aracılığı ile multivariate analiz yapıldı.

Tüm p-değerleri çift yönlü olup, $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

E-SONUÇLAR:

Ocak 1990 ile Mayıs 2005 arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hematoloji Polikliniği'nde tanı alan DBBHL'lı hastalar retrospektif olarak değerlendirilerek, verilerine ve patolojik kesitlerine net olarak ulaşılabilen 50 olgu (Tablo 1) çalışmaya dahil edildi.

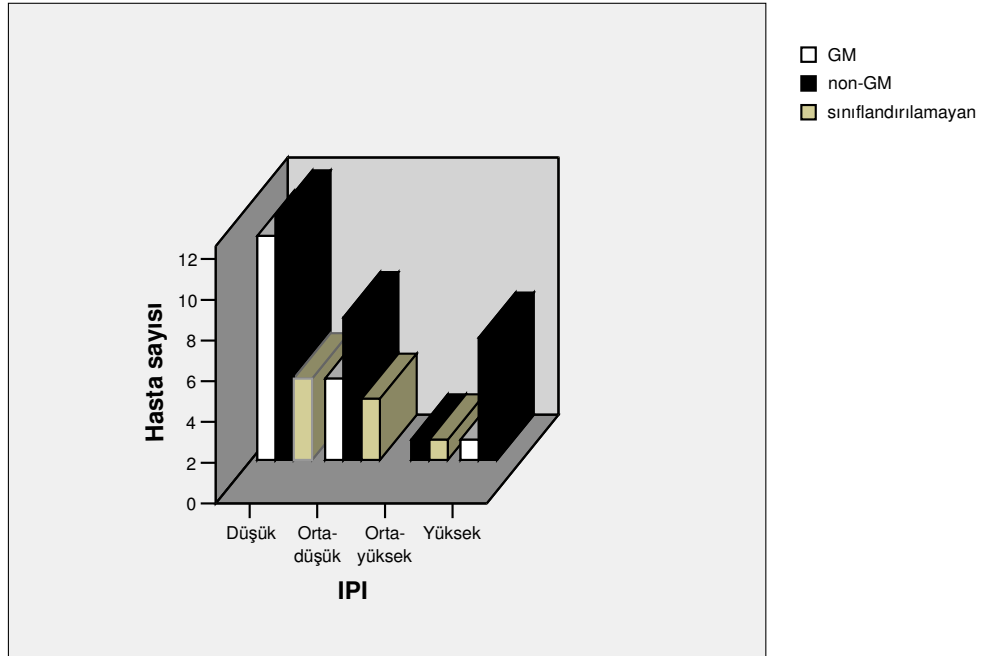
Çalışmaya dahil edilen olguların kadın erkek oranı (K/E) 21/29 olup, ortalama yaşı 57,6 medyan yaşı 55,5 (min-max: 17-95)'ti. Hastaların yaşayıp yaşamadıklarına ilişkin son durumları Nisan 2006 itibarıyla evlerine telefon edilerek netleştirildi. Yaşayan olguların ortalama takip süresi 52 ay (medyan: 39 ay, min-max:10-160 ay)'di.

Hastaların tanı anındaki klinik ve laboratuvar değerleri aşağıdaki tabloda verildi (Tablo 1). Olguların %26'sı (13 hasta) evre I, %40'ı (20 hasta) evre II, %18 (9 hasta) evre III, %16 (8 hasta)'sı evre IV'tü. ECOG performans durumuna göre dağılımları şöyleydi: ECOG<2: 38 hasta (%76) (ECOG 0: 26 hasta, ECOG 1: 12 hasta), ECOG≥2: 12 hasta (%24) (ECOG 2:9 hasta, ECOG 3: 3 hasta). Ortalama LDH düzeyleri 478.28 IU (medyan: 463,5 IU, min-max: 143 -1621 IU) olan hastalar IPI'ye göre, düşük risk [0:%26 (13 hasta), 1: %28 (14 hasta)] orta-düşük risk [2: %28 (14 hasta)], orta-yüksek risk [3:%4 (2 hasta)], yüksek risk [4:%14 (7 hasta)] olarak kaydedildi.

IPI skorlarına göre, GM, non-GM (ABH) ve sınıflandırılmayan hastaların dağılımına bakıldığında IPI'si düşük olan hastaların 11'inin GM, 12'sinin non-GM (ABH), 4'ünün sınıflandırılmayan grup, IPI'si orta-düşük olan hastaların 4'ünün GM, 7'sinin non-GM (ABH), 3'ünün sınıflandırılmayan grup, IPI'si orta-yüksek olan hastaların 1'inin non-GM, 1'inin sınıflandırılmayan, IPI'si yüksek olan hastaların ise 1'inin GM, 6'sının non-GM (ABH) olduğu görüldü (Resim 1). İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte ($p=0.2$), GM tanı hastaların çoğunlukla IPI'si düşük ve orta-düşük grupta yer aldığı gözlemlendi.

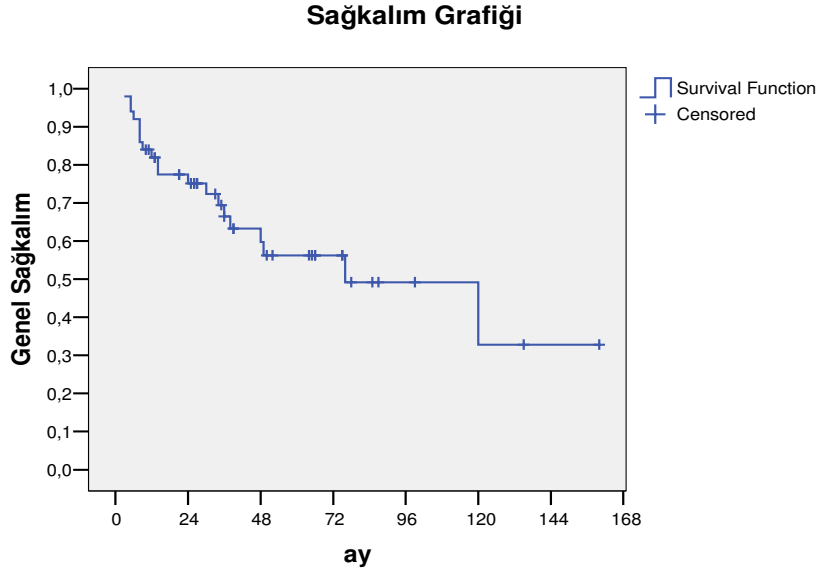
	N (hasta sayısı)	Ortalama	medyan	Min-max
Kadın / Erkek	21/29			
Yaş		57.6	55.5	17-95
Evre	I II III IV	13 (%26) 20 (%40) 9 (%18) 8 (%16)		
LDH (iu)		478.28	463.5	143-1621
ECOG	<2 ≥2	38 (%76) 12 (%24)		
Ekstranodal tutulum sayısı	<2 ≥2	45 (%90) 5 (%10)		
IPI	0 1 2 3 4	13 (%26) 14 (%28) 14 (%28) 2 (%14) 7 (%14)		
Survey	ölü Sağ	20 (%40) 30 (%60)		

Tablo 1: Hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri



Resim 1: GM, non-GM (ABH) ve sınıflandırılmayan olguların IPI skorlarına göre dağılımı

Hastaların yaşam durumları Nisan 2006 tarihinde güncelleştirildi. Hastaların %60'ının yaşadığı, %40'ının ölü olduğu tesbit edildi. Genel sağkalım analizi yapıldığında tüm hastalar için medyan sağkalım süresinin 75 ay, 5 yıllık yaşam hızlarının ise % 56 olduğu görüldü (Resim 2).



Resim 2: Tüm hastaların genel sağkalım grafiği

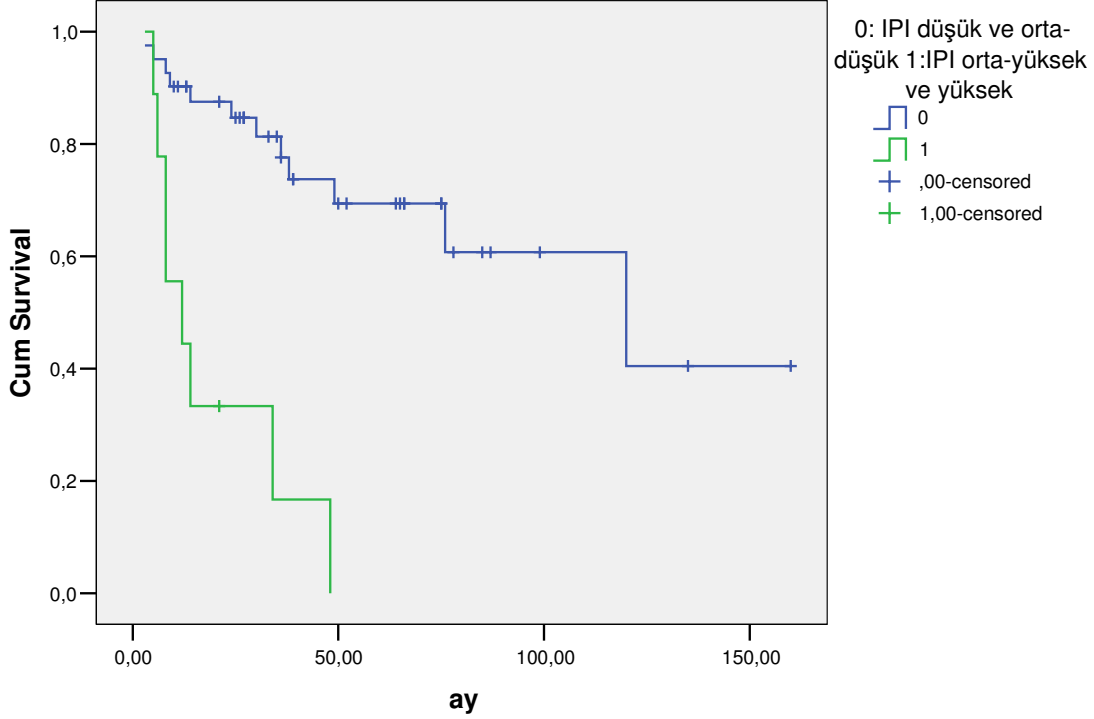
İlk sıra tedaviye yanıt açısından hastalar değerlendirildiğinde %62'sinde (31/50) tam yanıt (CR), %6'sında (3/50) teyit edilmemiş tam yanıt (CRu), %16'sında (8/50) kısmi yanıt (PR) elde edilmiş olduğu görüldü. Ancak hastaların %2'si (1/50) tedaviyi kabul etmemiş, %14'ü (7/50) de tedaviyi yarıda bırakarak tedavisiz izlenmişti. Hastaların %78'i (39/50) progrese olmuştu. Progresyon zamanları ortalama 8.3 aydı (medyan=0 ay, min-max:0-144).

IPI'ye göre yanıt oranlarına bakıldığında düşük risk grubunda (27 hasta) CR oranı %92, orta-düşük grupta ise %64.3'tü. IPI orta-yüksek (2 hasta) ve yüksek risk (7 hasta) grubunda ise CR elde edilemediği, PR elde edildiği görüldü.

İlk sıra tedaviye yanıt veren olguların 2 yıllık sağkalımı %87, 5 yıllık sağkalımı %65 iken, ilk sıra tedaviye yanıt vermeyen olguların 2 yıllık sağkalımı %12 idi.

Olgular ayrıca IPI skorları düşük riskli (IPI düşük,orta-düşük) ve yüksek riskli (IPI orta-yüksek,yüksek) gruplar olarak ayrıldı. IPI'nin TS (Resim 3) ve OS üzerinde etkisi istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0.0001, p=0.01).

Sağkalım Analizi



Resim 3:IPI (Düşük,orta-düşük/orta-yüksek,yüksek) skorunun TS üzerindeki etkisi (p=0.0001).

İmmünohistokimyasal boyaları değerlendirildiğinde, hastaların %20'sinde (10/50) CD10, %30'unda (15/50) bcl-6, %54'ünde (27/50) mum-1, %38'inde (19/50) bcl-2 pozitif olarak bulundu. Her proteinin TS ve OS üzerindeki etkisi tablo 2'de verildi. CD10 ekspresyonunun TS'yi anlamlı uzattığı bulunurken (135 ± 11 ay x 49 ± 21 ay, p=0.04), mum-1 ekspresyonunun ise anlamlı olarak kısalttığı görüldü (48 ± 27 ay x 105 ± 11.1 ay, p=0.009). Bcl-6 ve bcl-2'nin TS üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.05, p=0.9). Proteinlerin OS üzerindeki etkisi de istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo 2).

Bcl-2'nin tüm gruplar arasında, GM dışı grup üzerinde TS üzerindeki etkisine bakıldı. İstatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (p=0.7).

	CD10	Bcl-6	Mum-1	Bcl-2
Pozitif (hasta)	%20 (10/50)	%30 (15/50)	%54 (27/50)	%38 (19/50)
Negatif (hasta)	%80 (40/50)	%70 (35/50)	%46 (23/50)	%62 (31/50)
Tüm sağkalım (TS) (p)	*0.04	0.05	*0.009	0.3
Olaysız sağkalım (OS)(p)	0.1	0.08	0.1	0.9

Tablo 2: İmmünohistokimyasal profiller ve TS-OS üzerine etkisi

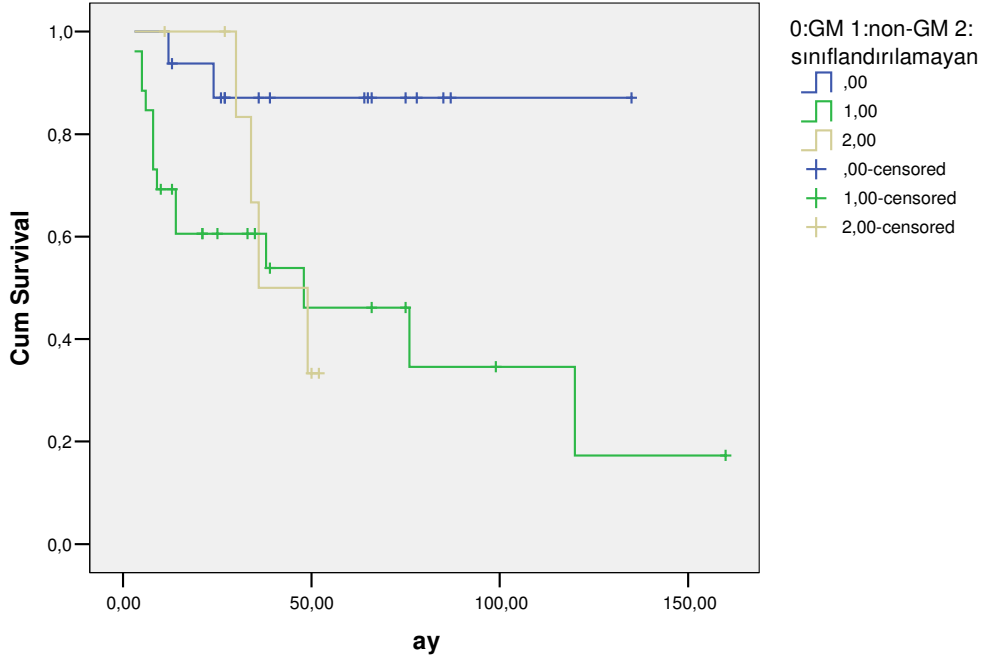
Olgular immünohistokimyasal olarak sınıflandırıldıklarında hastaların %30'u (15/50) GM, %54'ü (27/50) non-GM (GM dışı), %16'sı (8/50) sınıflandırılmayan (her üç protein ekspresyonu negatif) grupta yer aldı. Gruplar arasında TS açısından istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu (135 ± 9 ay x 48 ± 27 ay x 36 ± 9 ay, $p=0.008$) (Resim 4). OS üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.1$). 5 yıllık sağkalım oranları değerlendirildiğinde GM hastalarının %92, non-GM (ABH) % 44, sınıflandırılmayan grubun % 33 olarak kaydedildi (Tablo 3).

Olgular GM ve GM olmayanlar [non-GM (ABH) + sınıflandırılmayan] olarak ayrıldıklarında TS'e bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde (135 ± 9 ay x 48 ± 8.6 ay, $p=0.002$) GM olanların yaşam sürelerinin uzun olduğu görüldü (Resim 5). OS üzerindeki etkileri de anlamlıydı (33.9 ay x 21.8 ay, $p=0.04$). 5 yıllık TS açısından değerlendirildiğinde de (GM: %92, diğer: %40) GM grubu diğer gruba göre anlamlı ölçüde üstündü ($p=0.02$). Sınıflandırılmayan grup çıkarıldığında (8 hasta) da GM ile GM dışı gruplar arasında TS üzerinde istatistiksel yönden anlamlılığın devam ettiği görüldü ($p=0.009$).

	2 yıllık sağkalım oranı	5 yıllık sağkalım oranı
Germinal Merkez (GM)	% 92	% 92
Germinal Merkez dışı (non-GM)(ABH)	% 58	% 44
Sınıflandırılmayan	% 83	% 33

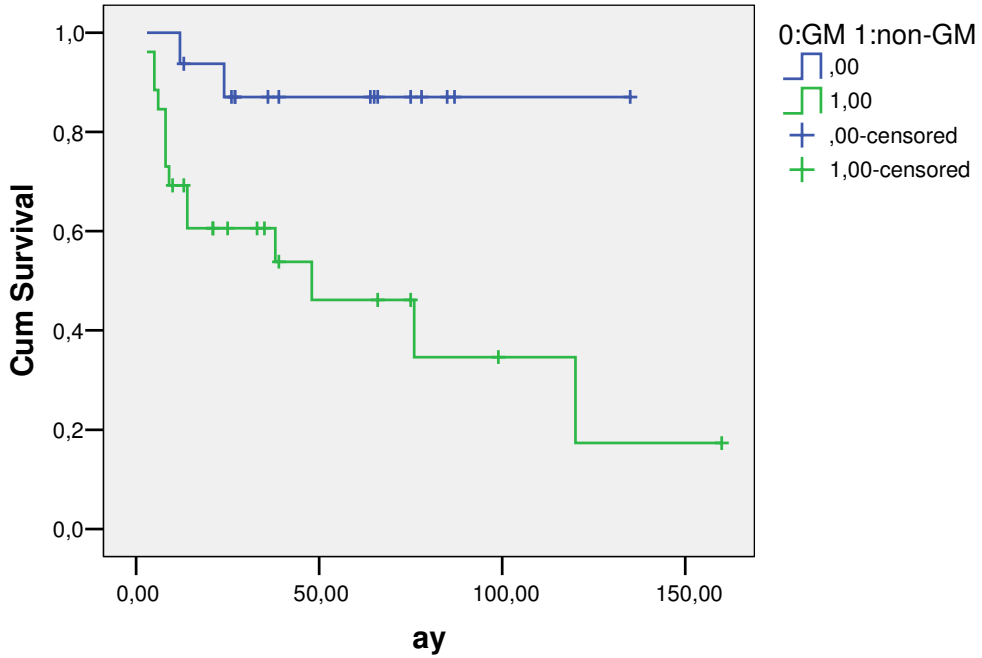
Tablo 3: Grupların 2 yıllık ve 5 yıllık sağkalım oranları

Sağkalım Analizi



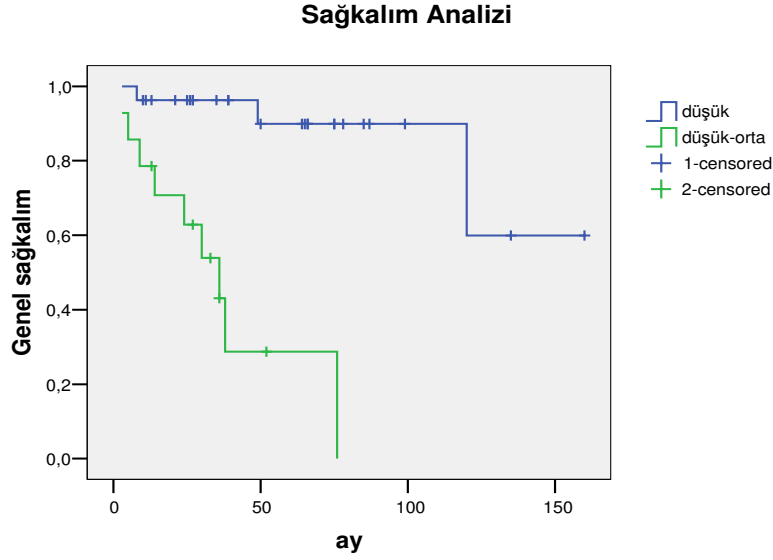
Resim 4: İmmünohistokimyasal sınıflandırmanın (GM, GM dışı, sınıflandırılmayan) TS üzerindeki etkisi (p=0.008)

Sağkalım Analizi



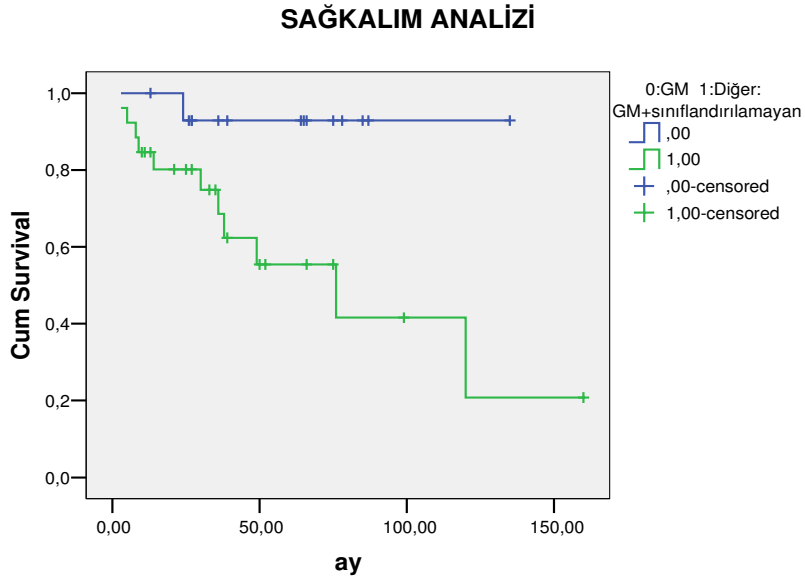
Resim 5: GM ve diğerleri (non-GM=ABH+sınıflandırılmayan)'nin TS üzerindeki etkisi

IPI'si düşük olan grup tek başına ele alındığında (41 hasta) (IPI düşük ve orta-düşük) düşük grubun genel sağkalımının diğer grubunkinden anlamlı ölçüde iyi olduğu görüldü ($p=0.0001$) (Resim 6). Düşük IPI'si olan GM hücreli NHL grubunun TS'ı diğer gruba (non-GM+sınıflandırılmayan) göre uzundu ($135\text{ay} \times 76 \pm 29\text{ay}$, $p=0.01$) (Resim 7). Sınıflandırılmayan hastalar çıkarıldıktan sonra da (7 hasta) GM'nin sağkalım üstünlüğünün devam ettiği görüldü ($p=0.02$) (Resim 8).



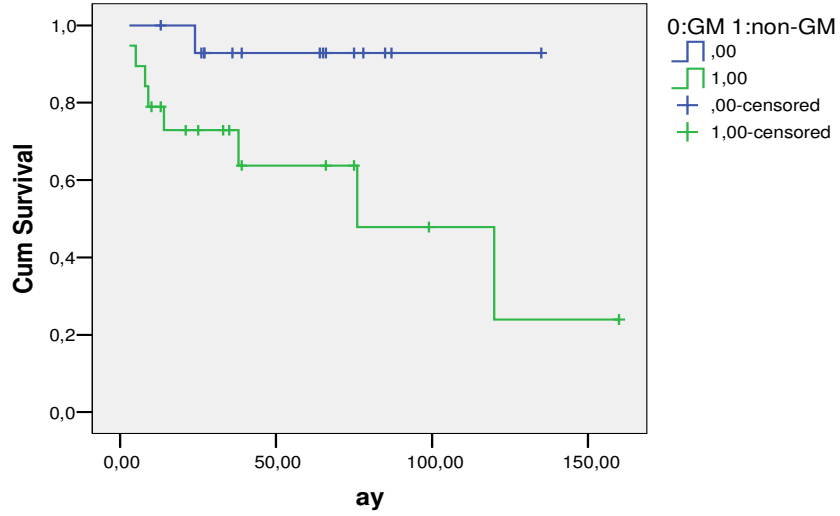
Resim 6:

IPI'si düşük ve düşük-orta gruplar arasında genel sağkalım analizi



Resim 7: Düşük IPI'si olan hasta grubunda immunhistokimyasal sınıflandırmanın (GM x diğer (ABH+sınıflandırılmayan)) TS üzerine etkisi (log-rank $p=0.01$)

Sağkalım Analizi



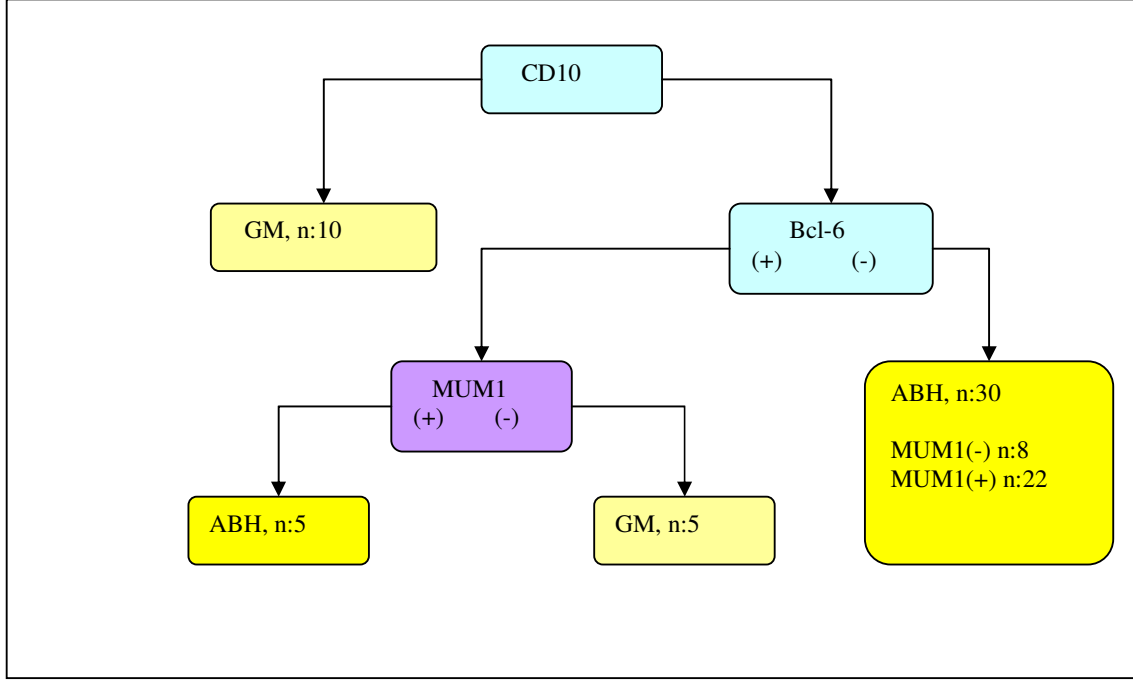
Resim 8: Düşük IPI'si olan hasta grubunda GM x non-GM olarak sınıflamanın TS üzerine etkisi (log-rank p=0.02)

CD 10, bcl 6, mum 1, bcl 2, IPI, immunohistokimyasal olarak sınıflandırmanın hepsinin OS üzerindeki etkisini bağımsız olarak multivariate (cox regression) analiz ile incelediğimizde sadece IPI'nin prognostik önemi olduğu (p=0.001) ve riski 5,3 kat arttırdığı gözlemlendi (HR:5,3).

Sağkalım üzerine etkileri ve bireysel prognostik önemlerini değerlendirmek için IPI, ilk sıra tedaviye yanıt durumu, immünhistokimyasal sınıflama (GM ve diğerleri şeklindeki) univariate analize alındı. İlk sıra tedaviye verilen yanıtın (CR+CRu+PR) sağkalım üzerindeki etkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde sağkalımı etkilediği görüldü (p=0.0001, RR: 10,6). GM dışı gruba dahil olmanın ölüm riskini 5,7 kat arttırdığı (p=0.02) izlendi. Veriler ile multivariate analiz yapıldığında ise IPI, ilk tedaviye yanıt durumu, immünhistokimyasal gruplandırmanın (GM ve diğerleri) bağımsız olarak prognostik önemi olduğu görüldü (tablo 4).

Değişkenler	Alt grupları	Risk Oranı (RR)	p
IPI	(Düşük+düşük-orta) x (orta-yüksek+yüksek)	4,8	0.002
İlk sıra tedaviye yanıt	Var (CR+CRu+PR) x yok	10,5	0.0001
İmmünhistokimyasal gruplar	GM x Diğerleri (AB hücreli+sınıflandırılmayan)	5,5	0.02

Tablo 4: Multivariate analiz sonuçları



Tablo 5:Hans ve arkadaşları tarafından yapılan sınıflamaya göre olgularımızın dağılımı

F-TARTIŞMA:

DBBHL histomorfolojik, immünofenotipik, genetik özellikleri ve klinik davranışı bakımından diğer lenfoma alt tiplerinden ayrılır (2,3,7). Hastaların %40'ı tedaviye çok iyi yanıt vermesine, uzun sağkalıma sahip olmasına rağmen, kalanı hastalıktan kaybedilmektedir (2). Yoğun tedavi modalitelerinin günümüz koşullarında elde edilebilirliği, prospektif olarak hasta gruplarını, prognozlarını daha net değerlendirebilme ihtiyacını gündeme getirmiştir (47). IPI NHL'de prognostik değerlendirmede son 10 yıldır yaygın olarak kullanılmaktadır (3). Lenfomanın seyrini etkileyebilecek klinik faktörlerin anlaşılmasında değerli olmasına rağmen, hastanın risk grubuna göre tedavi seçimini yönlendirmede yetersiz kalmaktadır. Yüksek risk hasta grubunun tedavisinde çok yoğun tedavilerin kullanılmasına ilişkin farklı sonuçlar bildirilmiştir (48). Bu, IPI'nin çok iyi ya da çok kötü prognostik özellikli hasta grubunu net ayıramıyor olmasına bağlanabilir. Literatürde IPI'si düşük olan grupta CR oranı %87, düşük-orta grupta ise %67 olarak bildirilmiştir. Bu yönden bakıldığında verilerimiz literatür ile benzerlik göstermektedir (% 92, %64,3). Ancak IPI'si orta-yüksek ve yüksek olan gruplardaki hastalarımızın CR oranlarına bakıldığında CR elde edilemediği, PR elde edildiği,

IPI'si düşük ve orta-düşük grubun kendi içinde de sağkalım açısından farklılıklar gösterdiği izlendi (Resim 6). Bu nedenle çalışmamızda IPI yanında diğer prognostik faktörlerin varlığı retrospektif olarak araştırıldı. Hasta grubumuzun çoğunlukla IPI'si düşük ve orta-düşük risk grubunda olması dikkat çekiciydi (41 olgu). IPI'nin grupları arasındaki dağılımın homojen olmaması, hastaların retrospektif olarak taranarak, verileri net olanların çalışmaya dahil edilmesine bağlandı. IPI'nin TS ve OS üzerinde etkisi istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.0001$, $p=0.01$). IPI düşük ve orta-düşük olguların sağkalımları daha uzundu.

Aynı sınıfa giren kanser hastaları, tedavi söz konusu olduğunda farklı yanıtlar verebilmektedir ve bu klinik heterojenite tümörlerin kendi içindeki moleküler/biyopatolojik farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir (49). Son yıllarda DBBHL için prognostik faktörler DNA mikroarray kullanılarak değerlendirilmektedir. Bu tekniğin günümüzde ve gelecekte kanser gen araştırmalarında oldukça yararlı olması beklenmektedir. Alizadeh ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada gen ekspresyon profillerine göre DBBHL, GM B hücreli, AB hücreli olarak alt gruplara ayrılmış ve GM B hücreli lenfomanın prognozunun diğer alt tipinden daha iyi olduğu gösterilmiştir (7). Fakat bu teknolojinin pahalı olması ve klinik uygulanabilirliğinin kolay olmaması nedeni ile DBBHL'yı basit olarak alt sınıflara ayırabilecek immünohistokimyasal yöntemler geliştirilmiştir (38). Ancak bu yolda yapılan çalışmalarda da farklı sonuçlar elde edilmektedir.

CD10 GM kökenli hücrenin spesifik bir belirteci olmakla birlikte sensitif değildir. Sıklıkla iyi prognozla ilişkili olduğu vurgulanmıştır (50,51). Ancak Uherova ve ark. (52) ile Xu ve arkadaşlarının (53) çalışmalarında CD10 ekspresyonunun kötü prognozla ilgili olduğu rapor edilmiştir. Bunun nedeni, sonraki çalışmalarda CD10 ekspresyonu yanında aktivasyon belirteçlerinden en az birinin de beraberinde pozitif olması olabilir. Bizim çalışmamızda aktivasyon belirteci olarak mum-1 kullanıldı. Mum-1 pozitif olan olgular AB hücreli DBBHL olarak sınıflandırıldı. Olgularımızın hiçbirinde CD10 ve mum-1 pozitifliği birliktelik göstermiyordu. Bu nedenle CD10'un tek başına sağkalım analizine etkisine bakıldığında, olguların yaşam sürelerinin CD10 negatif olan gruptan daha uzun olduğu görüldü ($p=0.04$). Bulgular Ohshima ve ark (50) ile Chang ve arkadaşlarının (51) çalışmaları ile uyumluydu.

Bcl-6, GM B hücreleri tarafından eksprese edilen bir proteindir. Bcl-6'yı içeren gen değişiklikleri DBBHL'nın %16-37'sinde görülmektedir. Fakat pek çok çalışmada hastalık seyrini etkilemediği gösterilmiştir (23,54-56). Bir çalışmada TS'yi iyi yönde etkilediği gösterilirken (57), diğer iki çalışmada ise TS'yi kısalttığı vurgulanmıştır (58-59). Bcl-6 ekspresyonunun immünohistokimyasal çalışmaları ve onun DBBHL'da sağkalım üzerine

etkilerine yönelik veriler oldukça sınırlıdır. Colomo ve arkadaşlarının çalışmasında (43) bcl-6 ekspresyonunun TS'yi etkilemediği belirtilirken, diğer çalışmalarda OS'yi uzattığı fakat TS'yi etkilemediği (60), veya TS'in iyi olacağı tahmininde rol oynadığı (61-62) gösterilmiştir. Hans ve arkadaşlarının çalışmasında ise bcl-6'nın hem TS, hem de OS üzerinde iyileştirici etkileri belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda ise tek başına bcl-6'nın TS ve OS üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkisi bulunmadı. Bcl-6'sı pozitif olan olgularımızın sayısı 10'du. Ancak bunların 5'inde aktivasyon belirteci olan mum-1 de pozitif. Beraberinde gen ekspresyon profilleri çalışılmadığı için bu olguların klinik paternlerinin AB hücreli DBBHL'ya mı, yoksa GM hücreli DBBHL'ya mı benzediği konusunda yorum yapılamadı. Ancak Hans ve arkadaşlarının çalışmasında beraberinde cDNA tekniği de kullanıldığından bcl-6 (+) ve mum-1 (+) grubun özelliklerinin AB hücreli olanlarla benzer olduğu vurgulanmıştır. Çalışmamızdaki olgu sayısının bu çalışma ile karşılaştırıldığında az olması yorum yapmamızı güçleştirmiş olabilir (bcl-6'nın TS üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı değil, p=0.05). Ancak bcl-6 diğer belirteçler ile bir arada değerlendirilerek alt gruplara ayrıldığında istatistiksel anlam kazandığı görülecektir. Ayrıca çalışmalarda farklı monoklonal antikolar kullanılmış olması, farklı merkezlerde farklı sonuçlar elde edilmiş olmasına neden olmuş olabilir.

Mum-1 plazma hücrelerinde ve germinal merkez hücrelerinin çok az bir kısmında normalde eksprese edilirken, DBBHL'nın %50-77'sinde eksprese edildiği rapor edilmiştir (63,64). Mum-1'in germinal merkez B hücre farklılaşmasının son basamağında, plazma hücre farklılaşmasına doğru eksprese edildiği ortaya konmuştur (65). Bu yönüyle bakıldığında mum-1'in GM dışı DBBHL fenotipini yansıtması gerektiği düşünülmektedir. Literatürde mum-1'in anlamlı ölçüde TS ve OS üzerinde kötü yönde etkisi olduğu vurgulanmıştır (38). Bizim çalışmamız da literatürü destekledi. Tümör hücrelerinde Mum-1 ekspresyonunun %20 üzerinde pozitif olması TS'de anlamlı ölçüde kısalmaya neden oldu (p=0.009). Fakat OS üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Bcl-2 antiapoptotik bir protein olup, lenfoma hücrelerinin kemoterapiye direncinden sorumludur (36). Bcl-2'nin ise DBBHL'daki prognostik değeri oldukça tartışmalıdır. Bcl-2 gen varlığı üzerinden yapılan çalışmalarda olduğu gibi, immünohistokimyasal olarak bakılan ekspresyon paternlerin değerlendirildiği çalışmalarda da farklı sonuçlar elde edilmiştir. Literatürde bcl-2 ekspresyonu GM olgularında %50, %67, GM dışı DBBHL'da ise %45, %62 pozitif olarak bildirilmiştir (43,66). Hans ve arkadaşlarının çalışmasında ise %59, %43 (GM,GM dışı) bildirilmiştir (38). Bu çalışmada tek başına bcl-2'nin TS ve OS üzerinde prognostik önemi olmadığı bulunmuştur (38). Bizim grubumuzda

ise GM DBBHL olgularının %20'sinde, GM dışı olguların ise %45.7'sinde pozitif saptandı. Tek başına TS ve OS üzerindeki etkisi incelendiğinde prognostik etkisi gösterilemedi. Ancak Hans ve arkadaşları cDNA mikroarray sınıflamasına göre grupları ele aldıklarında GM dışı olgularda bcl-2 pozitifliğinin hastalık seyrini kötü etkilediğini vurgulamışlardır. Bu yönüyle gen ekspresyon profillerinin çalışılmasının immünohistokimyasal yöntemlere göre sınıflandırmaya ek katkısından bahsedilebilir.

Çalışmalarda bireysel olarak immünohistokimyasal protein ekspresyonlarının DBBHL'da prognostik önemleri araştırıldığı gibi, son çalışmalarda cDNA mikroarray çalışmalarına yakın prognostik gruplar oluşturabilmek için immünohistokimyasal protein ekspresyon grupları çalışılmıştır. DNA mikroarray çalışmasında elde edilen prognostik alt gruplara benzer en yakın immünohistokimyasal gruplandırma, Hans ve arkadaşlarının çalışmasında ortaya konmuştur (GM: CD10+ ve/veya bcl-6+ ve Mum-1- ; GM dışı: CD10- ve bcl-6+ veya bcl-6- ve Mum-1+). Mum-1 bir aktivasyon belirteci olup, bu proteini eksprese eden grup aktive B hücre benzeri DBBHL olarak ta adlandırılmıştır (ABH). Bazı çalışmalarda bcl-6 pozitifliğinin de beraberinde bulunması bu grubun (CD10-,bcl-6+,Mum-1+) aktive GM hücreli DBBHL olarak adlandırılmasına neden olmuştur (45). Bu çalışmada CD10-,bcl-6- ve Mum-1+ olan grup ise aktive GM dışı DBBHL olarak sınıflandırılmış, ancak TS açısından GM grubu diğer iki gruba göre anlamlı ölçüde üstün bulunmuştur (45). Hans ve ark ise mum1 pozitifliğini her koşulda (bcl-6 pozitif olsa da) GM dışı (ABH DBBHL) grup olarak ele almışlardır. Önceki çalışmalar ile benzer olarak (7,8,38) bizim çalışmamızda da GM B hücreli DBBHL'nın TS'sinin GM dışı diğer gruplardan daha iyi ve uzun olduğu görüldü. Her üç belirteci negatif olan olgular (sınıflandırılmayan grup) gerek ayrı sınıf olarak, gerekse GM dışı olgular içine dahil edilerek (ABH olarak) tüm istatistiksel analizler tekrar edildi. Bu grubun ayrı ele alınmasının TS üzerinde anlamlı katkısı olmadı. Bu haliyle Hans ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi CD10 ve bcl-6 negatif olan grup GM dışı (ABH DBBHL) olarak ele alındı. Literatür ile uyumlu olarak TS ve OS'nin GM hücreli DBBHL'da anlamlı ölçüde uzun olduğu görüldü (p=0.002, p=0.04). Literatürde 5 yıllık sağkalım oranının GM olgularında %76, GM dışı olgularda %34 olduğu (p=0.001) ve bulguların cDNA mikroarray kullanılarak elde edilen sonuçlar ile benzer olduğu vurgulanmıştı. Bizim çalışmamızda da literatüre benzer olarak GM olgularında 5 yıllık sağkalım oranı %92, GM dışı olgularda %40 olup GM olgularının sağkalım oranı anlamlı ölçüde yüksekti (p=0.02).

Çalışmada ele alınan grubumuzun çoğunlukla IPI düşük (düşük+düşük-orta) risk sınıfına sahip olmasına rağmen bu grupta dahi GM ve GM dışı gruplar arasında anlamlı sağkalım farkının olması, IPI dışında sınıflamanın da tedavi modaliteleri seçiminde önemli

olduğunu vurgulamaktadır. IPI yüksek grubumuzun sayısı az olmakla birlikte (9 olgu), hepsi de GM dışı grupta olup, sağkalım oranları düşüktü. IPI, immünohistokimyasal gruplandırma (GM ve GM dışı), ilk sıra tedaviye yanıt durumları multivariate analizde ele alındığında, tümünün bağımsız prognostik önemi olduğu görüldü. Sonuçlar literatürü destekliyordu (38,45).

Sonuçlarımız genel olarak değerlendirildiğinde, DBBHL'da GM ve GM dışı şeklindeki immünohistokimyasal sınıflamanın daha gerçekçi bir prognostik bilgi sağlayacağı gösterildi. Sınıflamanın gen ekspresyon profillerine dayalı olarak yapılmasının prognostik önemi önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak bu yöntemin pahalı olup her yerde kolaylıkla uygulanabilir olmaması, verilerimizin de benzer çalışmaları desteklediği göz önüne alındığında immünohistokimyasal olarak gruplandırmanın (CD10, bcl-6, mum-1 kullanılarak) tedavi kararlarını alırken klinisyene yardımcı olacağını birkez daha vurguluyoruz.. Her geçen gün immünohistokimyada yeni belirteçler bulunmasına rağmen, sınırlı sayıdaki üç belirteç ile dahi GM ve GM dışı sınıflamasının en azından olanakları sınırlı bölgelerde yeterli olabileceği kanısındayız. Fakat DBBHL'da sahip olduğu heterojenite nedeniyle yeni tedavi modalitelerinin geliştirilmesi açısından halen prognostik başka faktörlerin çalışılmasına ihtiyaç vardır.

G-KAYNAKLAR

1. Armitage JO, Weisenburger 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.
2. A clinical evaluation of the International Lymphoma: the Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood.* 1997; 89:3909-3918.
3. 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.
4. Coiffier B. Diffuse large cell lymphoma. *Curr Opin Oncol.* 2001;13:325-334.
5. Gatter K, Warnke RA. Diffuse Large B-cell lymphoma. In: Jaffe ES, Stein H, Vardiman JW, eds. *World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* Lyon, France: IARC Press, 2001: 171-174.
6. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood.* 1994;84:1361-1392.
7. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature.* 2000;403:503-511.
8. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002;346:1937-1947.
9. Koen van Besien and Fernando Cabanillas. Clinical manifestations, staging, and treatment of non-Hodgkin lymphoma. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P. *Hematology Basic Principles and Practice*, 3rd edition, Philadelphia, Churchill Livingstone; 2000: 1293-1339.
10. McCurley TL, Macon WR. Diagnosis and Classification of Non-Hodgkin Lymphomas. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B. *Wintrobe's Clinical Hematology*, Second Edition, Philadelphia, Lippincott, Williams and Wilkins; 2004:2301-2323.
11. Trumper L, Brittinger G, Diehl V, Harris NL. Non-Hodgkin's lymphoma: a history of classification and clinical observations. In: Mauch PM, Armitage JO, Coiffier B, Dalla-Favera R, Harris NL, eds. *Non-Hodgkin's Lymphomas.* New York, NY: Lippincott, Williams and Wilkins; 2004:3-19.

12. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer*. 1982;49:2112-2135.
13. Shipp MA, Harrington DP, Anderson JR, et al. 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.
14. Rodriguez J, Cabanillas F, McLaughlin P et al: A proposal for a simple staging system for intermediate grade lymphoma and immunoblastic lymphoma based on the 'tumor score'. *Ann Oncol* 3:711,1992.
15. Klein U, Goossens T, Fischer M, et al. Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol Rev*. 1998; 162:261-280.
16. Chaganti RS, Nanjangud G, Schmidt H, Teruya-Feldstein J. Recurring chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphoma: biologic and clinical significance. *Semin Hematol*. 2000; 37:396-411.
17. Bea S, Colomo L, Lopez-Guillermo A, et al. Clinicopathologic significance and prognostic value of chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol*. 2004; 22:3498-3506.
18. Pasqualucci L, Bereschenko O, Niu H, et al. Molecular pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma: the role of Bcl-6. *Leuk Lymphoma*. 2003; 44(suppl 3): S5-12.
19. Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, et al. The bcl-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet*. 1997; 16:161-170.
20. Phan RT, Dalla-Favera R. The bcl6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 2004; 432:635-639.
21. Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993; 81: 151-157.
22. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90:244-251.
23. Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998; 92: 3152-3162.
24. Ladanyi M, Offit K, Jhanwar SC, Filippa DA, Chaganti RS. MYC rearrangement and translocations involving band 8q24 in diffuse large cell lymphomas. *Blood* 1991; 77: 1057-1063.

25. Muschen M, Rajewsky K, Kronke M, Kuppers R. The origin of CD95-gene mutations in B-cell lymphoma. *Trends Immunol.* 2002;23:75-80.
26. Davidson WF, Giese T, Fredrickson TN. Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective Fas-Fas ligand interactions. *J Exp Med.* 1998;187:1825-1838.
27. Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, et al. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 2001; 98:194-200.
28. Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 1999;341:1520-1529.
29. Bassing CH, Suh H, Ferguson DO, et al. Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell.* 2003;114:359-370.
30. Offit K, Wong G, Filippa DA, Tao Y, Chaganti RS. Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: clinical correlations. *Blood.* 1991;77:1508-1515.
31. Schouten HC, Sanger WG, Weisenburger DD, Anderson J, Armitage JO. Chromosomal abnormalities in untreated patients with non-Hodgkin's lymphoma: associations with histology, clinical characteristics, and treatment outcome. The Nebraska Lymphoma Study Group. *Blood.* 1990;75:1841-1847.
32. Cabanillas F, Pathak S, Grant G, et al. Refractoriness to chemotherapy and poor survival related to abnormalities of chromosomes 17 and 7 in lymphoma. *Am J Med.* 1989;87:167-172.
33. Yunis JJ, Mayer MG, Arnesen MA, Aeppli DP, Oken MM, Frizzera G. bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large -cell lymphoma. *N Engl J Med* 1989; 320:1047-1054.
34. Gascoyne RD. Emerging prognostic factors in diffuse large B cell lymphoma. *Curr Opin Oncol.* 2004;16:436-441.
35. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med.* 2002;8:68-74.
36. Grace Wu, Armand Keating. Biomarkers of potential prognostic significance in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer* 2006;106:247-257.

37. Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, et al. Prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of 6 genes. *N Engl J Med.* 2004;350:1828-1837.
38. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103:275-282.
39. Ebert BL, Golub TR. Genomic approaches to hematologic malignancies. *Blood* 2004;104:923-932.
40. Yamaguchi M, Seto M, Okamoto M, et al. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. *Blood.* 2002;99:815-821.
41. Wright G, Tan B, Rosenwald A, et al. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:9991-9996
42. Ansell SM, Stenson M, Habermann TM, Jelinek DF, Witzig TE. CD4+ T-cell immune response to large B-cell non-Hodgkin's lymphoma predicts patient outcome. *J Clin Oncol* 2001;19:720-726.
43. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2003;101:78-84.
44. Cheson BD, Hosing SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol* 1999; 17:1244-1253.
45. Chang CC, McClintock S, Cleveland RP, Trzpuck 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.
46. Dogan A, Bagdi E, Munson P, Isaacson PG. CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol* 2000;24:846-852.
47. Coiffier B. Diffuse large cell lymphoma. *Curr. Opin. Oncol.* 2001;13:325-334.
48. Strehl J, Mey U, Glasmacher A et al. High dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation as first line therapy in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: a meta-analysis. *Haematologica* 2003;11:1304-1315.

49. Zinzani PL, Dimhofer S, Sabattini E, Alinari L, Piccaluga PP, Stefoni V, Tani M, Musuraca G, Marchi E, Falini B, Baccarani M, Pileri SA. Identification of outcome predictors in diffuse large B-cell lymphoma. Immunohistochemical profiling of homogeneously treated de novo tumors with nodal presentation on tissue micr-arrays. *Haematologica* 2005;90:341-347.
50. Ohshima K, Kawasaki C, Muta H et al. CD10 and Bcl10 expression in diffuse large B-cell lymphoma: CD10 is a marker of improved prognosis. *Histopathology* 2001; 39:156-162.
51. Chang CC, Cleveland RP, Perkins SL. CD10 expression and survival. *Am J Clin Pathol.* 2002;117:660-661.
52. Uherova P, Ross CW, Schnitzer B, et al. The clinical significance of CD10 antigen expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2001;115:582-588.
53. Xu Y, McKenna RW, Kroft SH. Assessment of CD10 in the diagnosis of small B-cell lymphomas: a multiparameter flow cytometric study. *Am J Clin Pathol.*2002;117:291-300.
54. Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP, et al. LAZ 3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients. *Blood* 1994;83:2423-2427.
55. Pescarmona E, De Sanctis V, Pistilli A, et al. Pathogenetic and clinical implications of bcl-6 and bcl-2 gene configuration in nodal diffuse large B –cell lymphomas. *J Pathol.* 1997;183:281-286.
56. Vitolo U, Gaidano G, Botto B, et al. Rearrangements of bcl-6, bcl-2, c-myc and 6q deletion in B-diffuse large-cell lymphoma: clinical relevance in 71 patients. *Ann Oncol.* 1998;9:55-61.
57. Offit K, Lo Coco F, Louie DC, et al. Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 1994;331:74-80.
58. Akasaka T, Ueda C, Kurata M, et al. Nonimmunoglobulin (non-Ig)/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma results in worse prognosis than Ig/BCL6. *Blood.* 2000;96:2907-2909.
59. Barrans SL, O'Connor SJ, Evans PA, et al. Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2002;117:322-332.

60. Zhang A, Ohshima K, Sato K, et al. Prognostic clinicopathologic factors, including immunologic expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Pathol Int.* 1999;49:1043-1052.
61. Takeshita M, Iwashita A, Kurihara K, et al. Histologic and immunohistologic findings and prognosis of 40 cases of gastric large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2000;24:1641-1649.
62. Lossos IS, Jones CD, Warnke R, et al. Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2001;98:945-951.
63. Natkunam Y, Warnke RA, Montgomery K, Falini B, van De Rijn M. Analysis of MUM1/IRF4 protein expression using tissue microarrays and immunohistochemistry. *Mod Pathol.* 2001;14:686-694.
64. Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, et al. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood.* 2000;95:2084-2092.
65. Gaidano G, Carbone A. MUM1: a step ahead toward the understanding of lymphoma histogenesis. *Leukemia.* 2000;14:563-566.
66. Barrans SL, Carter I, Owen RG, 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.