

# Ekstranodal Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomada Bcl-2 ve Myc Ekspresyon Birlikteliğinin Tedavi Yanıtı ve Prognoza Etkisinin Geriye Dönük Olarak Değerlendirilmesi

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

Ceren KONCA<sup>1</sup>(ID), Nilay ERMANTAŞ<sup>2</sup>(ID), Ümit ÇOBANOĞLU<sup>3</sup>(ID), Özlen BEKTAŞ<sup>4</sup>(ID), Nergiz ERKUT<sup>4</sup>(ID), Mehmet SÖNMEZ<sup>4</sup>(ID)

<sup>1</sup> Rize Devlet Hastanesi, İç Hastalıkları Kliniği, Rize, Türkiye

<sup>2</sup> İstanbul Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Hematoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup> Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Trabzon, Türkiye

<sup>4</sup> Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Trabzon, Türkiye

\* Bu çalışma, "5<sup>th</sup> International Congress on Leukemia-Lymphoma-Myeloma (May 21-23, 2015 Istanbul, Turkey)"da bildiri olarak sunulmuştur.

### ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmada, ekstranodal diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL) olan hastalarda immünhistokimyasal ve moleküler yöntemlerle saptanan double hit lenfoma (DHL)'nin genel ve progresyonsuz sağkalıma etkisinin araştırılması amaçlandı.

**Hastalar ve Yöntem:** Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalında ekstranodal DBBHL tanısı alan 31 hasta (17'si kadın, 14'ü erkek; ortalama yaş 57) dahil edildi. Hasta bilgileri retrospektif olarak incelendi ve hastaların tanı yaşı, cinsiyeti, ekstranodal tutulum alanları, hastalık evresi, risk grubu, histopatolojik tanısı, "International Prognostic Index (IPI)" skoru, tanı anındaki laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyi, kemik iliği tutulumu ve B semptomları varlığı, almış oldukları tedaviler değerlendirilerek progresyonsuz ve genel sağkalım süreleri tanımlandı. Tüm hastaların patolojik dokularında, immünhistokimyasal boyamayla bcl-6, bcl-2, myc, CD10, Mum-1 ve moleküler olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile bcl-2 ve myc ekspresyonları değerlendirildi.

**Bulgular:** Immünhistokimyasal yöntemle bcl-2 ve myc birlikteliğinin olduğu bir DHL saptanınırken, moleküler analiz ile altı hastada DHL izlendi. PCR'nin bcl-2 ekspresyonunu saptamadaki duyarlılığı %33.3, özgüllüğü %80, myc ekspresyonunu saptamadaki duyarlılığı %95, özgüllüğü %90.9 olup, myc ve bcl-2 titrelelerindeki yükseklik arasında da korelasyon mevcuttu. DHL'li hastaların üç ve altı aylık genel sağkalım oranları sırasıyla %50 ve %16 iken, DHL'li olmayan hastalarda sırasıyla %88 ve %76 olarak bulundu. Üç ve altı aylık progresyonsuz sağkalım sürelerine bakıldığında DHL'li hastalarda sırasıyla %51 ve %33, DHL'li olmayan hastalarda ise sırasıyla %88 ve %76 olarak saptandı. DHL'li hastalarda genel ve progresyonsuz sağkalım germinal merkez B hücreli (GMBH), GMBH dışı histopatolojik tiplerden bağımsız olarak kısa bulundu ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ).

**Makale atfı:** Konca G, Ermantaş N, Çobanoğlu Ü, Bektaş Ö, Erkut N, Sönmez M. Ekstranodal diffüz büyük B hücreli lenfomada bcl-2 ve myc ekspresyon birlikteliğinin tedavi yanıtı ve prognoza etkisinin geriye dönük olarak değerlendirilmesi. LLM Dergi 2019;3(4):92-100.

### Yazışma Adresi

**Prof. Dr. Mehmet SÖNMEZ**

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Hematoloji Bilim Dalı,  
Trabzon-Türkiye

**Geliş:** 26.12.2019 - **Kabul:** 16.01.2020

**E-posta:** mesonmez@yahoo.com

**Sonuç:** Ekstranodal DBBHL'li hastalarda DHL varlığının genel ve progresyonsuz yaşam süresinde kıalmaya neden olan bağımsız bir etki gösterdiği, DHL'yi tanımlamada moleküler yöntemin immünohistokimyasal değerlendirmeye göre daha özgül ve duyarlı olduğu, dolayısıyla hastaların tedavisinin planlanmasında önemli olabileceği kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Double hit lenfoma; Bcl-2; Myc; Sağkalım; Prognoz; Diffüz büyük B hücreli lenfoma

## ABSTRACT

**Objective:** We aimed to investigate the effects of immunohistochemical and molecular presence of double hit lymphoma (DHL) (combined expression of myc and bcl-2) on overall and progression-free survival rates of patients with extranodal diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL).

**Patients and Methods:** A total of 31 patients (17 female, 14 male; mean age 57 years) with diagnosis of extranodal DLBCL were included into the study (patients in the 2008-2013 period, Karadeniz Technical University Medical School). In a retrospective manner, patient characteristics were noted [age at diagnosis, sex, sites of extranodal involvement, stage, high-risk group, histopathological diagnosis, International Prognostic Index (IPI) score, lactat dehydrogenase (LDH) level at diagnosis, bone marrow involvement, and treatment modalities]. Histopathological specimens underwent immunohistochemical (bcl-6, bcl-2, myc, CD10, Mum-1) and molecular (bcl-2 and myc, by means of PCR) analysis.

**Results:** DHL was observed immunohistochemically in only one patient, while molecular studies found six cases. The sensitivity of PCR to detect bcl-2 and myc expressions was 33% and 95% and the specificity was 80% and 91%, respectively. There was a correlation between myc and bcl-2 titers. Three-month overall survival rates were 50% and 88% in DHL positive and negative groups, respectively. Six-month overall survival rates were 16% and 76% in DHL positive and negative groups, respectively. Progression-free 3-month survival rates were 51% and 88% in DHL positive and negative groups, respectively. Progression-free 6-month survival rates were 33% and 76% in DHL positive and negative groups, respectively. Overall and progression free survival was short regardless of histopathological type of germinal and non-germinal center B cell lymphoma ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** We conclude that DHL presence in patients with extranodal DLBCL was an independent factor leading to shortened overall or progression-free survival. The molecular method is more specific and sensitive than immunohistochemical evaluation to identify DHL, and therefore it may be important while planning the treatment of patients.

**Key Words:** Double hit lymphoma; Bcl-2; Myc; Survival; Prognosis; Diffuse large B cell lymphoma

## GİRİŞ

Diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL), non-Hodgkin lenfomalar (NHL)'in en yaygın alt tipini oluşturur ve erişkinlerde en sık görülen lenfoid malignitedir. Lenf nodu ve/veya ekstranodal yapılarda gelişebilir. Ekstranodal tutulumu yeni tanı alan hastaların %40'ına yakınında rastlanmaktadır. Sıklıkla gastrointestinal bölge, cilt, kemik iliği, paranasal sinüsler, tiroid, santral sinir sistemi (SSS), karaciğer ve dalak tutulumları izlenir (1,2). Agresif seyir göstermesine rağmen tedavi yanıtları iyi olup kür şansı olan bir malignitedir. Uzun süreli takiplerde, hastaların %75-80'inde tam remisyon görülebilirken, hastalıksız sağkalım oranı yaklaşık %50 olarak belirtilmektedir (3,4).

DBBHL'ler, morfolojik, immünojenik ve sitogenetik özellikler açısından belirgin biyolojik heterojenite göstermektedir. Köken aldığı hücrelerin gen ekspresyon profillerine göre germinal merkez B hücreli (GMBH), aktive B hücreli (ABH) ve tip 3 olmak üzere üç farklı histopatolojik alt gruba ayrılmış olup, GMBH'li DBBHL'nin diğer gen ekspresyon profillerine göre daha iyi prognoza sahip olduğu gözlenmektedir (5). DBBHL patogeneğinde onkogenler ve tümör süpresör genlerde meydana gelen değişikliklerin önemli rol oynadığının saptanması sonrası, hücre proliferasyonunda düzenleyici rol oynayan myc onkogeni değişimleri DBBHL'li hastalarda kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (6).

Takiben myc ve bcl-2 gen ekspresyonunun birlikte olduğu, tanı anında yüksek laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyi, B semptomları varlığı ve ekstranodal tutulumların sıklıkla izlendiği, DBBHL'den daha kötü prognoza sahip olan double hit lenfomalar (DHL) tanımlanmıştır (7).

Bcl-2 geni 18. kromozomda yer alan apoptoza engel olarak B hücre sağkalımını sağlayan bir protoonkogendir ve kemoterapi direnci ile ilişkilidir. Normalde bcl-2 ekspresyonu apoptozun B hücre negatif seleksiyonunda önemli rol oynamaktadır. DBBHL'de bcl-2 ekspresyonunda artış olması olumsuz prognozu gösterir (8,9). Bcl-2 deregülasyonu, DBBHL olgularının yaklaşık %28'inde t(14;18) ile birliktedir. Ancak, DBBHL olgularının yaklaşık %50'sinde t(14;18)'den bağımsız bcl-2 aşırı ekspresyonu saptanabilmektedir (2). Myc, 62 kDa ağırlığında, hücre siklusu progresyonunu sağlayacak bazı genleri aktive ederken (Siklin D1, D2 ve CDK4 gibi) aynı zamanda bazı inhibitör proteinleri (p21CIP1 ve p27KIP1) de inhibe eden, farklı yollardan apoptozisi aktive eden bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. DBBHL olgularının yaklaşık %15'inde bulunmaktadır. Genelde t(8;14) varlığında izlenmektedir (8). Myc yeniden düzenlenmesi daha sık olarak ekstranodal tutulumlu DBBHL veya insan immünyetmezlik virüsü (HIV) pozitif hastalarda görülmektedir ve genellikle agresif klinik gidiş ile ilişkili bulunmaktadır.

Bcl-2 ve myc birlikteliğinin olduğu DHL'ler agresif tümörler olup, tanı anında genellikle ileri evdedirler. Kemik iliği, periferik kan ve SSS tutulumunun sık olarak gözlemlendiği bu lenfoma alt tipinin agresif davranışı tümörlerin proliferatif (myc) ve anti-apoptotik (bcl-2) onkoproteinleri aynı anda eksprese etmesiyle açıklanabilmektedir (7).

Bu çalışmada, ekstranodal DBBHL'li hastalarda immün-histokimyasal ve moleküler yöntemlerle saptanan DHL varlığının, tedavi yanıtlarına ve yaşam sürelerine etkilerinin araştırılması planlandı.

## HASTALAR ve YÖNTEM

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi lokal etik kurulu tarafından, 15.07.2013/40 numarasıyla onaylandıktan sonra, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalında 2008-2013 yılları arasında ekstranodal DBBHL tanısı alan 31 hasta çalışmaya dahil edildi. Düşük dereceli B hücreli lenfomadan transforme olan ve HIV pozitif olan olgular çalışmaya dahil edilmedi. Hasta izleminde kullanılan dosyalar retrospektif olarak incelendi ve hastaların tanı yaşı, cinsiyeti, ekstranodal tutulum alanları, hastalık evresi, risk grubu, histopatolojik tanısı, "International Prognostic Index (IPI)" skorları, tanı anındaki LDH düzeyleri, kemik iliği tutulumu ve B semptomları varlığı saptandı. Tüm hastalara R-CHOP tedavisi uygulanmış olduğu tespit edildi. Tüm bu veriler değerlendirilerek progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalım süreleri belirlendi. Tüm hastaların patolojik dokularında immünhistokimyasal olarak bcl-6, bcl-2, myc, CD10, Mum-1 ve moleküler olarak bcl-2 ve myc ekspresyonları değerlendirildi. Alınan sonuçlara göre morfolojik subgruplar belirlenerek bu subgrupların sağkalıma etkilerinin olup olmadığı araştırıldı. Moleküler olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile bcl-2 ve myc birlikteliği tespit edilen DHL olgularının prognozları, prognozlarına etkili olabilecek ek parametreler, bu olguların morfolojik varyantlarla ilişkileri belirlendi.

## İmmünhistokimyasal Analiz

Çalışmaya dahil edilen 31 parafine gömülü doku örneğinin tamamında bcl-6 Ab-2 Monoklonal Antibody (BL6.02; same asPG-B6p, Thermo Scientific, MS-1114-R7, USA), bcl-2 A1 Monoklonal Antibody (ab24502, Abcam, UK), myc Ab-2 Monoklonal Antibody (9E10.3, Thermo Scientific, MS-139P0, USA), CD10 (56C6, Leica, NCL-CD10-270) ve Mum-1 protein Monoklonal Antibody (Mum-1p, Dako, m7259, Denmark) ile immünhistokimyasal boyama yapıldı. Hazırlanan preparatlar mikroskopta incelenerek boyanma dereceleri yarı kantitatif bir yöntemle değerlendirildi. Pozitif boyanan tümör hücrelerinin tüm tümör dokusuna oranı belirlendi. Tümör hücrelerinin %30'dan fazlası boyanmışsa pozitif, boyanan tümör hücrelerinin oranı %30'dan az ise negatif olarak kabul edildi. Pozitif ve negatif sonuçla-

ra göre Hans algoritması kullanılarak olguların morfolojik olarak GMBH, GMBH dışı şeklinde sınıflaması yapıldı. Ayrıca myc ve bcl-2 birlikteliği tespit edilen olgular DHL olarak belirlendi.

## Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Her hastanın parafine gömülü doku bloklarından beşer adet 5 mikron kalınlığında kesitler PCR çalışılmak üzere eppendorf tüplerine alındı. Eppendorf tüpleri içerisinde bulunan doku kesitlerinden ilk aşamada RNA elde etmek amacıyla QIAGEN Rneasy FFPE kiti kullanıldı. Elde edilen RNA'dan cDNA sentezinde RT<sup>2</sup> HT First Strand kit (96-330411 kullanıldı. Real-time PCR aşamasında PCR tüpünde kit içerisinde bulunan RT2 SYBR Green Mastermix'ten (12.5 µL), RT<sup>2</sup>qPCR Primer Assay'den (1 µL), daha önceki reaksiyonlarda elde edilen cDNA'dan (1 µL) ve RNase-free sudan (10.5 µL) oluşan 25 µL'lik bir karışım elde edildi. İşlem sonucunda her gen için bir Ct (threshold cycle) değeri elde edildi. Orijinal gen ekspresyon değeri ile Ct arasında bir ters orantısal ilişki bulunduğundan ilgili her gen için orijinal ekspresyon düzeyi (L) 2<sup>-Ct</sup> olarak ifade edildi. Bir kontrol genine göre ilgili genin ekspresyon düzeyinin normalizasyonu iki genin ekspresyon düzeylerinin oranlanmasıyla bulundu. Gen ekspresyonunun katlı değişiminin (fold change) saptanması için ilgili genin ekspresyon düzeyinin normalizasyonu kontrol örneğine oranlandı. Fold-regülasyon biyolojik olarak anlamlı kat değişimlerini ifade etmek için kullanıldı. Fold-change değeri > 1 ise up-regülasyon ya da pozitiflik, < 1 olması durumu ise down regülasyon ya da negatiflik olarak kabul edildi. Bcl-2 ve myc pozitifliğinin birlikte olduğu olgular DHL olarak kabul edildi.

## İstatistiksel Yöntem

Hastaların tanısından ölüme kadar geçen süreleri toplam sağkalım, tanıdan progresyona kadar geçen süre progresyonsuz sağkalım olarak kabul edildi. Verilerin analizi SPSS for Windows 13.0 paket programında yapıldı. Hastaların DHL mevcudiyeti immünhistokimyasal ve PCR sonuçlarına göre ayrı ayrı değerlendirildi. DHL tespit edilen ve GMBH, GMBH-dışı varyantlara sahip hastalar belirlendi. Kaplan Meier yöntemiyle sağkalım analizleri yapıldı. DHL tanımlamasında kullanılan myc ve bcl-2 genlerinin tespitinde immünhistokimyasal ve PCR yöntemlerinin özgüllük ve duyarlılıkları değerlendirildi. Bu değerlendirmelerde kategorik veriler arasındaki ölçümle belirlenenlerin karşılaştırılmasında ki-kare testi, ölçümsel verilerin karşılaştırılmasında veriler normal dağılıma uyuyorsa student's testi, uymuyorsa Mann-Whitney U testi kullanıldı. P< 0.01 olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. PCR yöntemi ile saptanan myc translokasyonu ve bcl-2 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi değerlendirmede Pearson korelasyon analizi kullanıldı.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan 31 hastanın 17 (%54.8)'si kadın, 14 (%45.2)'ü erkek olup ortalama yaş 57 olarak bulunmuştur. Elli yaş ve üzerinde 22 (%70.9) hasta, 50 yaş altında ise 9 (%29.1) hasta mevcuttu. Tanı anında tam kan sayımlarından tespit edilen ortalama lökosit sayısı 7700/ $\mu$ L (3000-12.800/ $\mu$ L), hemoglobin değeri 12.3 g/dL (9.7-15.3 g/dL), trombosit sayısı 318.387/ $\mu$ L (155.000-474.000/ $\mu$ L), monosit sayısı 700/ $\mu$ L (200-2500/ $\mu$ L) ve lenfosit sayısı 1700/ $\mu$ L (700-4300/ $\mu$ L); ortalama LDH düzeyi 440 U/L (178-922 U/L), sedimentasyon hızı 41 (4-120), C-reaktif protein seviyesi 3.23 mg/dL (0.1-45 mg/dL) olarak bulunmuştur.

Çalışmada yer alan hastaların primer tutulum alanlarına bakıldığında; sekiz hastanın mide, üç hastanın kolonundan alınan örneklerden tanı konmuş olup gastrointestinal sistem tutulumunun daha sık (%35.5) olduğu, bunu tonsil tutulumunun (%12.9) izlediği gözlenmiştir (Tablo 1).

Olguların tümünde ekstrasnodal tutulum diffüz ve disemine olduğundan evreleri evre IV olarak kabul edilmiştir. IPI skoru; 4 (%12.9) hastada 2, 27 (%87.1) hastada 3 ve üzeri olarak bulunmuştur (Tablo 2). Hastalarda kemik iliği tutulumu mevcut olmayıp, 10 (%32.3)'ünde tanı anında B semptomları mevcuttu.

İmmünohistokimyasal yöntemle bcl-2 ekspresyonunun 7 (%22.6) hastada, myc ekspresyonunun 2 (%6.5) hasta-

da pozitif olduğu, buna karşılık PCR ile bcl-2'nin 6 (%19.4) hastada, myc'nin ise 21 (%67.7) hastada eksprese edildiği izlenmiştir. İmmünohistokimyasal olarak bcl-2 ve myc'nin birlikte eksprese edildiği bir hasta saptanırken, PCR ile 6 (%19.4) hastada bcl-2 ve myc'nin birlikte ekspresyonu gözlenmiştir. İmmünohistokimyasal yöntemle bcl-2 ekspresyonu olan yedi olgudan ikisinin ve myc ekspresyonu olan iki olgudan birinin PCR yöntemi ile de pozitif olduğu gözlenmiştir. PCR'nin bcl-2 ve ekspresyonunu saptanmadaki duyarlılığı ve özgüllüğü Tablo 3'te sunulmuştur. Resim 1a ve 1b bcl-2 ve myc ile immünohistokimyasal boyama paternlerini göstermektedir.

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

DHL'li olan altı hastanın ve DHL'li olmayan hastaların üç aylık genel sağkalımı, sırasıyla %50 ve %88; altı aylık genel sağkalımı %16 ve %76 olup istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0.001$ ) (Şekil 1a, Tablo 4). DHL hastalarının üç ve altı aylık progresyonsuz sağkalımı, sırasıyla %50.6 ve %33, DHL'li olmayan hastaların %88.6 ve %76 olup, istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0.001$ ) (Şekil 1b, Tablo 4).

**Tablo 1. Hastaların demografik özellikleri**

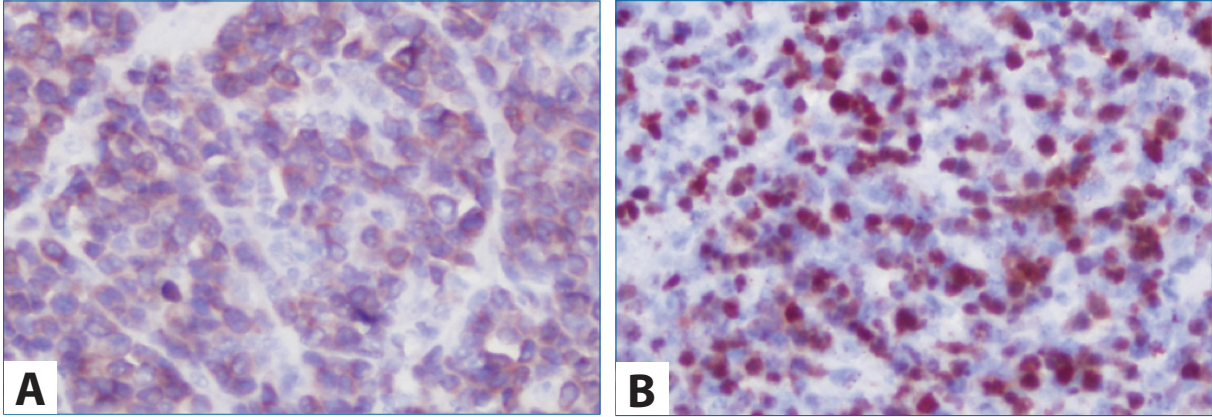
Demografik özellik	Sayı (n= 31)	%
Yaş grupları		
< 50 yaş	9	29.1
> 50 yaş	22	70.9
Cinsiyet		
Erkek	14	45.2
Kadın	17	54.8
Primer tutulum alanı		
Gastrointestinal sistem	11	36.6
Tonsil	4	12.9
Diğerleri (beyin, testis, cilt, kemik, over, böbrek, kemik)	14	45.1

**Tablo 2. IPI skoruna göre hasta sayıları**

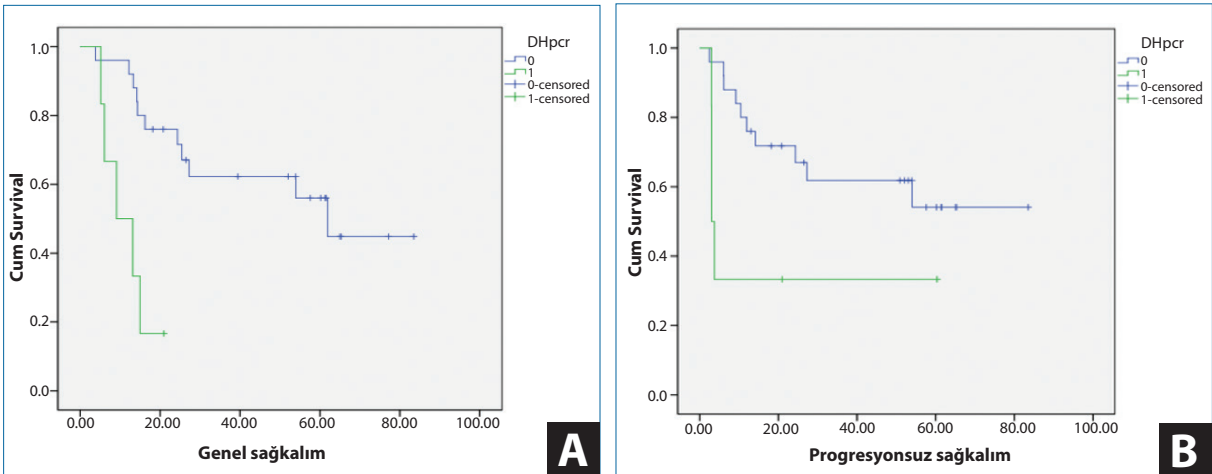
IPI skoru	Sayı (n= 31)	%
0-1	-	-
2	4	12.9
3	18	66.6
4	9	20.5

**Tablo 3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin özgüllük ve duyarlılığı**

	Myc		Bcl-2		Bcl-2 + Myc	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
İmmünohistokimyasal	2	29	7	24	1	30
PCR	21	10	6	25	6	25
	<b>PCR</b> Özgüllük: %90.9 Duyarlılık: %95		<b>PCR</b> Özgüllük: %80 Duyarlılık: %33.3			



**Resim 1. A.** İmmünohistokimyasal boyama ile bcl-2 ekspresyonu, **B.** İmmünohistokimyasal boyama ile myc ekspresyonu.



**Şekil 1. A.** DHL hastalarının genel sağkalımı, **B.** DHL hastalarının progresyonsuz sağkalımı.

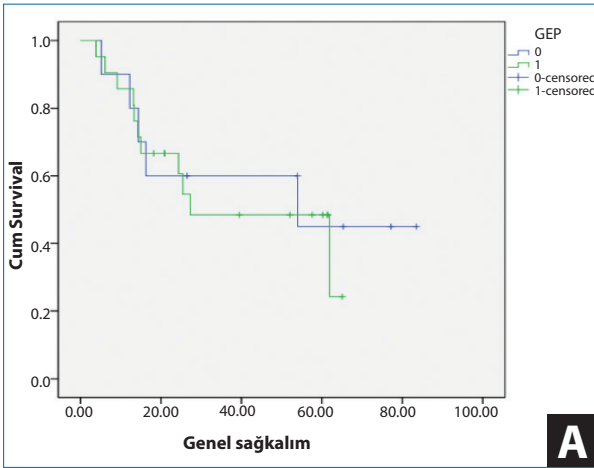
**Tablo 4. Double hit lenfoma (DHL) hastalarının genel ve progresyonsuz sağkalımı**

	DHL pozitif (%)	DHL negatif (%)	p
3 aylık genel sağkalım	50	88	
6 aylık genel sağkalım	16	76	< 0.001
3 aylık progresyonsuz sağkalım	50.6	88.6	
6 aylık progresyonsuz sağkalım	33	76	< 0.001

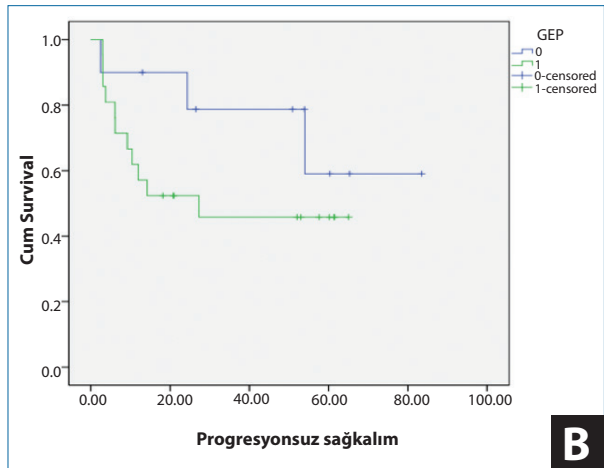


Tablo 5. Myc ve Bcl-2 PCR korelasyon analizi

	Myc PCR	Bcl-2 PCR
Myc PCR pearson correlation	1	0.363
Sig.		0.45
N	31	31
Bcl-2 PCR pearson correlation	0.363	1
Sig.	0.45	
N	31	31



A



B

Şekil 2. A. GMBH/GMBH dışı DBBHL hastalarının genel sağkalımı, B. GMBH/GMBH dışı DBBHL hastalarının progresyonsuz sağkalımı.

Tablo 6. GMBH/GMBH dışı DBBHL hastalarının genel ve progresyonsuz sağkalımı

	GMBH (%)	GMBH dışı (%)	p
3 aylık genel sağkalım	70	85	AD
6 aylık genel sağkalım	45	71	AD
3 aylık progresyonsuz sağkalım	78	85	AD
6 aylık progresyonsuz sağkalım	59	71	AD

DBBHL: Diffüz büyük B hücreli lenfoma, GMBH: Germinal merkez B hücreli, AD: Anlamli değil.

DHL'li hastalarda PCR ile bakılan myc ve bcl-2 titrelerindeki yükseklikler arasında korelasyon izlenmiştir ( $r = 0.45$ ,  $p < 0.01$ ) (Tablo 5).

Hans algoritması kullanılarak histopatolojik olarak 21 (%67.7) hasta GMBH dışı, 10 (%32.3) hasta GMBH olarak tanımlanmış olup iki grup arasında cinsiyet, evre, IPI skoru, B semptomları varlığı, progresyonsuz ve genel sağkalımları değerlendirildiğinde anlamlı fark bulunmamıştır (Şekil 2a, 2b) (Tablo 6).

## TARTIŞMA

Moleküler çalışmalarda nodal ve ektranodal DBBHL'lerin genetik olarak farklı kökenden kaynaklandığının saptanması üzerine, nodal ve ektranodal lenfomaların farklı

biyolojik ve klinik özelliklere sahip olduğu düşünülmeye başlanmıştır (10). Moller ve arkadaşları, ektranodal ve nodal DBBHL'lerin klinik özelliklerinin farklı olduğunu belirterek ektranodal tutulum ile seyreden hastaların daha yaşlı ve performanslarının düşük olmasına karşın tümör yüklerinin daha düşük olduğunu göstermişler ve ektranodal tutulumlu evre IV hastaların yaşam sürelerinin nodal tutulum ile seyreden düşük evredeki hastalara göre daha uzun olduğunu saptamışlardır (1). Farklı özelliklere sahip olmasına karşın nodal lenfomalarda olduğu gibi ektranodal lenfomalarda da prognozu belirlemede IPI skoru kullanılmaktadır. Çalışmamızda, ektranodal DBBHL'li hastalarda IPI skoru ve hastalık evresinin genel ve progresyonsuz sağkalıma etkisinin olmadığı saptandı.

Literatürde de ekstranodal lenfomalarda IPI skorlama sistemi prognozu belirlemede yetersiz kaldığından, hastaların gen ekspresyon profilleri, genel sağkalım ve tedavi cevaplarını değerlendirmede kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla immünohistokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılarak hastalar GMBH ve GMBH dışı olarak ayrılmış ve bu farklı iki histopatolojik tipin hastaların prognozunu etkilediği saptanmıştır. Hans ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CD10 ve/veya CD10, Bcl-6 (+) ve Bcl-6 (-), CD10, Mum-1 (-) olan GMBH-DBBHL'li hastalarda beş yıllık sağkalım oranı %76, CD10, Bcl-6 (-) veya Bcl-6, Mum-1 (+) GMBH dışı DBBHL'li hastalarda ise %34 olarak bulunmuş ve duyarlılık GMBH için %70, GMBH dışı için %87 olarak tanımlanmıştır (11). Barrans ve arkadaşları da GMBH-DBBHL'nin genel sağkalımlarının daha iyi olduğunu göstermişlerdir (12). Buna karşılık, Jorge ve arkadaşları GMBH dışı DBBHL'li hastaların genel ve progresyonsuz sağkalım oranlarının GMBH-DBBHL'ye göre daha kısa olmakla birlikte çok değişkenli analizde benzer sonuçlar sağlanamadığını göstermişlerdir (13). Birçok çalışmada benzer sonuçlar elde edilmesi sonrasında, Bret ve arkadaşları gen ekspresyon profili farklılıklarının CHOP veya R-CHOP ile tedavi edilen hastalarda IPI'den bağımsız bir prognostik faktör olduğunu, ancak IPI ve gen ekspresyon profil birlikteliğinin daha güçlü bir prognostik sınıflama olabileceğini belirtmişlerdir (14). Çalışmamızda GMBH-DBBHL ve GMBH dışı DBBHL'ler arasında da genel ve progresyonsuz sağkalım açısından farklılık izlenmedi. Bu, olgu sayısının kısıtlılığına bağlı olabileceği gibi rituksimabın etkinliği ile de açıklanabilir. Yapılan çalışmalarda GMBH dışı DBBHL'li hastalarda nükleer faktör-kappa B (NF- $\kappa$ B) hedef genlerinin yoğun olarak bulunduğu ve rituksimabın NF- $\kappa$ B'yi baskıladığı gösterilmiştir (15). Fu ve arkadaşları kemoterapi protokollerine rituksimab eklenmesinin GMBH ve GMBH dışı DBBHL'li hastaların yaşam sürelerinde izlenen farklılığı düzelttiğini göstermişlerdir (16). Li ve arkadaşları da GMBH dışı DBBHL'li hastalarda R-CEOP tedavisi ile beş yıllık sağkalım oranlarının CEOP tedavisi alanlara göre daha yüksek olduğunu, GMBH-DBBHL'li hastalarda ise iki tedavi protokolü arasında ortalama sağkalım açısından fark olmadığını belirtmişlerdir (17). Çalışmamızda da tüm hastaların tedavisinde CHOP tedavi protokolü ile birlikte rituksimab kullanılmıştır. Dolayısıyla GMBH ve GMBH dışı DBBHL'li hastalarda total ve progresyonsuz yaşam sürelerinin farklı olmaması, bize tedavide rituksimab kullanımının etkili olduğunu telkin etmekteydi.

Çalışmamızda DHL'li hastalarda genel ve progresyonsuz sağkalım süreleri, DHL olmayanlara göre anlamlı oranda daha düşük bulundu. Bu da DHL'nin biyolojik davranışının farklı olabileceğini ve tedaviye rituksimab eklenmesinin de tedavi başarısını artıramadığını göstermekteydi. Bcl-2 ve myc geni yeniden düzenlenmesinin birlikte olduğu NHL'ler daha hızlı seyirli ve ileri evrede olup, kemik iliği ile SSS tutulumu sıklıkla izlenmektedir. Carlo ve

arkadaşları 327 DBBHL'li hastada saptadıkları sekiz DHL'li olguda R-CHOP tedavisi sonrası ortalama 12. ayda relaps geliştiğini ve dolayısıyla DHL'lerin daha kötü prognoza sahip olduklarını belirtmişlerdir (18). DHL görülme sıklığını ve prognozunu değerlendiren birçok çalışmada da benzer şekilde DHL'nin daha kötü prognoza sahip olduğu ve dolayısıyla hastaların yaşam sürelerinin daha kısa olduğu tanımlanmıştır (19-21). Ülkemizden Akyürek ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise, 239 DBBHL'li olguda saptanan altı DHL hastasının prognozlarının daha kötü ve ortalama sağkalım sürelerinin dokuz ay olduğu belirtilmiştir (22). Ayrıca Tomita ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada bu gruptaki hastaların standart R-CHOP tedavisi ya da kemik iliği transplantasyonunu da içeren tedavilere iyi sonuç vermediğini bildirmişlerdir (7).

Yapılan çalışmalarda DHL'li hastaların IPI skorlarının yüksek olduğu gözlenmiştir. Daniel ve arkadaşlarının çalışmasında 17 DHL hastasında %94 oranında LDH yüksekliği saptanmış olup, olguların 14'ü evre 4, 10 olgunun IPI skorlamasının da 3 ve üzeri olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada dokuz olguda kemik iliği tutulumu ve ekstranodal tutulum izlenirken, yedi hastada B semptomlarının mevcut olduğu görüldü. DHL'li hastalarda LDH düzeyi ve kemik iliği tutulumu anlamlı olarak yüksek saptandı (23). Bir başka çalışmada ise 29 DHL'li hastanın 16'sında B semptomlarının varlığı, 22'sinde yüksek IPI skoru ve 21'inde ileri evre hastalık izlenmiştir (24). Ancak bizim çalışmamızdaki hastalık evresi, LDH düzeyi, IPI skoru benzer olmasına karşın DHL'li hastaların genel ve progresyonsuz yaşam süresinin kısa olması, DHL ilişkili verilerin nodal ve ekstranodal DBBHL'lerin birlikte değerlendirildiği çalışmalardan farklı olarak sadece ekstranodal DBBHL'lerin değerlendirilmesine bağlı olabilir. Literatürde ilk kez sadece ekstranodal DBBHL'leri içeren bu çalışmada prognostik faktörlerden bağımsız olarak DHL'lerin kısa yaşam süresiyle birlikte olması, DHL'lerin klinik özelliklerinin farklı olduğunu göstermesi açısından oldukça önem arz etmektedir.

Çalışmamızda, ekstranodal DHL'li hastaların histopatolojik değerlendirmesinde GMBH veya GMBH dışı DBBHL varlığı genel ve progresyonsuz sağkalım üzerine etki göstermiyordu. Literatüre baktığımızda bu konuda farklı veriler olduğunu görmekteyiz. Shimin, Kobayashi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda hastalar GMBH/GMBH dışı olarak ayrıldığında yaşam süreleri değişmezken, DHL'li hastalarda GMBH dışı kaynaklı hastalık varlığı kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Buna karşılık Perry ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise DHL'li hastalarda GMBH hücre varlığının kötü prognoza neden olduğu gözlenmiştir (25-27). Bizim çalışmamızda ise ekstranodal DBBHL'nin köken aldığı doku bölgesinden bağımsız olarak DHL özelliği varlığında kötü prognoz ile birlikteydi. Bu durum bize DHL'nin prognozu göstermede bağımsız bir faktör olduğunu göstermekteydi.

Ayrıca, çalışmamızda DHL'yi göstermede immünohistokimyasal tetkiklere göre moleküler yöntemlerin daha duyarlı ve özgül olduğu gözlemlendi. İmmünohistokimyasal olarak bir hastada DHL saptanırken, moleküler yöntemle altı hastada DHL olduğu saptandı. Moleküler yöntemin bcl-2 ekspresyonunu saptamadaki duyarlılığının %33.3, özgüllüğünün ise %80, myc ekspresyonu saptamadaki duyarlılığının %95, özgüllüğünün ise %90.9 olduğu tespit edildi. Aynı zamanda bcl-2/myc ekspresyon artışlarının korelasyon gösterdiği izlendi. Bu durum bize immünohistokimyasal olarak DHL olarak tanımlanamayan hastaların moleküler yöntemlerle tanımlanabileceğini ve tanımlanan hastaların da prognozunun daha kötü olduğunu gösteriyordu. Nitekim yapılan çalışmalarda da moleküler yöntemlerin daha hassas olduğu, ancak immünohistokimyasal tetkikler gibi tarama testi olarak kullanımının zor olabileceği belirtilmektedir. Gelecekte standartların geliştirilmesiyle daha geniş klinik kullanımın olanak bulacağı düşünülmektedir (28,29).

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

#### ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi lokal etik kurulu tarafından, 15.07.2013/40 numarasıyla onaylandı.

#### ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarların çıkar çatışması bulunmamaktadır.

#### MALİ AÇIKLAMA

Çalışma için doğrudan veya dolaylı mali destek alınmadı. Çalışma ile ilgili herhangi bir firma veya kişi ile ilgili ticari bağlantı yoktur.

#### YAZAR KATKISI

Verilerin toplanması: CK; Vakaların takip ve tedavi aşamaları: NE, NU, MS; Verilerin değerlendirilmesi: ÜÇ; Makale yazımı: CK, ÖB, MS

#### KAYNAKLAR

1. Moller MB, Pedersen NT, Christensen BE. Diffuse large B-cell lymphoma: clinical implications of extranodal versus nodal presentation—a population-based study of 1575 cases. *Br J Haematol* 2004;124:151.
2. Ansell SM, Armitage J. Non-Hodgkin lymphoma diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2005;80:1087-97.
3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Fourth Edition, 2008.
4. Tondini C, Zanini M, Lombardi F. Combined modality treatment with primary CHOP chemotherapy followed by locoregional irradiation in stage I or II histologically aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 1993;11:720-5.

5. Poulsen CB, Borup R, Nielsen FC, Borregaard N. Microarray-based classification of diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2005;74:453-65.
6. De Paepe P, De Wolf Peeters C. Diffuse large B-cell lymphoma: a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas comprising several distinct clinicopathological entities. *Leukemia* 2007;21:37-43.
7. Tomita N, Tokunaka M, Nakamura N, Takeuchi K, Koike J, Motomura S, et al. Clinicopathological features of lymphoma/leukemia patients carrying both bcl2 and myc translocations. *Haematol* 2009;94:935-43.
8. Dominis M, Dzebro S, Gasparov S, Pesut A, Kusec R. Diffuse large B-cell lymphoma and its variants. *Croat Med J* 2002;43:535-40.
9. Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006;24:995-1007.
10. Clark HM, Jones DB, Wright DH. Cytogenetic and molecular studies of t(14;18) and t(14;19) in nodal and extranodal B-cell lymphoma. *J Pathol* 1992;166:129-37.
11. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103:275-82.
12. Barrans SL, Carter I, Owen RG, Davies FE, Patmore RD, Haynes AP, et al. Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the international prognostic index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2002;99:1136-43.
13. Castillo JJ, Beltran BE, Song MK, Ilic I, Leppa S, Nurmi H, et al. The hans algorithm is not prognostic in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Leuk Res* 2012;36:413-7.
14. Bret C, Klein B, Moreaux J. Gene expression-based risk score in diffuse large B cell lymphoma. *Oncotarget* 2012.
15. Jazirehi AR, Huerta-Yepe S, Cheng G, Bonavida B. Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: role in sensitization. *Cancer Res* 2005;65:264-76.
16. Fu K, Weisenburger DD, Choi WW, Perry KD, Smith LM, Shi X. Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2008;26:4587-94.
17. Li Y, Yimamu M, Wang X, Zhang X, Mao M, Fu L, et al. Addition of rituximab to a CEOP regimen improved the outcome in the treatment of non-germinal center immunophenotype diffuse large B cell lymphoma cells with high bcl-2 expression. *Int J Hematol* 2014;99:79-86.
18. Visco C, Tzankov A, Zijun Y, Xu-Monette, Miranda RN, Tai YC, et al. Patients with diffuse large B-cell lymphoma of germinal center origin with bcl-2 translocations have poor outcome, irrespective of myc status: a report from an international DLBCL rituximab-CHOP consortium program study. *Haematol* 2013;98:2.
19. Aukema M, Siebert R, Schuurung E. Double hit B-cell lymphomas. *Blood* 2011;117:2319-31.
20. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, Ben-Neriah S, Woods R, Steidl C, et al. Lymphomas with concurrent bcl-2 and myc translocations: the critical factors associated with survival. *Blood* 2009;114:2273-9.
21. Luo DL, Liu YH, Zhang F, Xu FP, Yan LX, Chen J, et al. B-cell lymphomas with concurrent myc and bcl-2/igh or bcl-6 translocations. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2013;42:584-8.



22. Akyurek N, Uner A, Benekli M, Barista I. Prognostic significance of myc, bcl-2, and bcl-6 rearrangements in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone plus rituximab. *Cancer* 2012;118:4173-83.
23. Landsburg DJ, Nasta SD, Svoboda J, Morrissette JJ, Schuster SJ. 'Double-hit' cytogenetic status may not be predicted by baseline clinicopathological characteristics and is highly associated with overall survival in B cell lymphoma patients. *Br J Haematol* 2014;166:369-74.
24. Cohen JB, Geyer SM, Lozanski G, Zhao W, Heerema NA, Hall NC, et al. Complete response to induction therapy in patients with myc-positive and double-hit non-Hodgkin lymphoma is associated with prolonged progression-free survival. *Cancer* 2014;120:1677-85.
25. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, et al. Myc/Bcl-2 protein co-expression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from the international DLBCL rituximab-CHOP. *Blood* 2013;121:4021-31.
26. Kobayashi T, Tsutsumi Y, Sakamoto N, Nagoshi H, Yamamoto-Sugitani M, Shimura Y, et al. Double-hit lymphomas constitute a highly aggressive subgroup in diffuse large B-cell lymphomas in the era of rituximab. *Jpn J Clin Oncol* 2012;42:1035-42.
27. Perry AM, Alvarado-Bernal Y, Laurini JA, Smith LM, Slack GW, Tan KL, et al. Myc and bcl-2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Br J Haematol* 2014;165:382-91.
28. Liu L, Cao F, Wang S, Zhou J, Yang G, Wang C. Detection of malignant B lymphocytes by PCR clonality assay using direct lysis of cerebrospinal fluid and low volume specimens. *Int J Lab Hematol* 2014.
29. Green TM, Nielsen O, De Stricker K, Xu-Monette ZY, Young KH, Moller MB. High levels of nuclear myc protein predict the presence of myc rearrangement in diffuse large B cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2012.