Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Olgularında Kromojen in Situ Hibridizasyon Yöntemi ile Epstein Barr Virüs Varlığının Araştırılması

Evaluation of Epstein Barr Virus in Diffuse Large B Cell Lymphomas by Using Chromogenic in Situ Hybridisation Technique

Aytül BUĞRA¹, Fetin Rüştü YILDIZ², Selver ÖZEKİNCİ², Gizem AYAZ³, Zeynep Betül ERDEM², Çağlar ÇAKIR²

¹ Adalet Bakanlığı, İstanbul Adli Tıp Kurumu Başkanlığı, Histopatoloji Şubesi, İSTANBUL

² Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Bölümü, İSTANBUL

³ Siirt Devlet Hastanesi, Patoloji Bölümü, SİİRT

Bu çalışma 29. Avrupa Patoloji Kongresinde (Amsterdam, 2017) poster bildirisi olarak sunulmuştur.

ÖZET

Amaç: Diffüz büyük B hücreli lenfomalar (DBBHL), etiyolojisi bilinmeyen bir Non-Hodgkin lenfoma (NHL)'dir. EBER (EBV RNA) varlığı; DBBHL'larda %8-11 arasında görülmekte; sıklıkla daha ileri yaşla, ileri evre hastalıkla ve DBBHL'nın anaplastik ve plazmoblastik alt tipleriyle ilişkili bulunmuştur. EBV (+) DBBHL'nın daha genç yaşlarda ve daha geniş spektrumda görülmeye başlanması sonucu oluşan yeni bilgiler ile, 2016 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) lenfoma sınıflamasındaki revizyon ile "yaşlılığın" yerine "başka türlü sınıflandırılmayan (NOS)" olarak değiştirilmiştir. Bu çalışma; DBBHL'nın immünofenotipik özelliklerini ortaya koymanın yanı sıra; bu olgularda kromojenik in situ hibridizasyon (CISH) yöntemi ile saptanan EBER varlığının olguların yaş ve cinsiyetleri ile ilişkisini göstermeyi amaçlamaktadır.

Gereç ve Yöntem: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Bölümü'nde Ocak 2015-Aralık 2016 tarihleri arasında DBBHL tanısı almış 61 olgunun patoloji raporları incelendi. Bu olguların Hematoksilen & Eosin (H&E) boyalı kesitleri, bcl-2, bcl-6 ve c-myc immünohistokimyasal boyalı preparatları ile EBER ISH çalışmasına ait preparatları tekrar değerlendirildi. Olgulardaki EBER varlığının, yaş, cinsiyet, bcl-2, bcl-6, c-myc boyanma yüzdeleri ile ilişkisi araştırıldı.

Bulgular: Çalışmaya alınan DBBHL olgularından, dört olguda EBER varlığı saptanmıştır. Bu olguların yaşları 34 ile 78 arasında değişmektedir. Ortalama yaş 57'dir. 50 yaş altında 3 olguda (ortalama yaş 43,6), 50 yaş üstünde 1 olguda boyanma izlenmiştir. EBER pozitif olan olguların 3'ü erkek, 1'i kadındır. Bcl-2 ile %85,3 (n=52), Bcl-6 ile %95,1 (n=58), c-myc ile %90,2 (n=55)'sinde değişen yüzdelerde boyanma izlenmiştir. EBER varlığının yaş, cinsiyet, bcl-2, bcl-6 ve c-myc ekspresyonu ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç: Çalışmamızdaki olgularda %6,6 oranında EBER varlığı saptanmıştır. Erkeklerde daha fazla pozitiflik görülmüştür. EBV pozitif DBBHL'ların yaş ortalaması literatürdeki veriler ile benzerdir. EBER varlığının sadece yaşlı hasta grubunda değil tüm yaşlardaki DBBHL olgularında araştırılması, hem immünofenotipik bulgular ile ilişkisini saptamak, hem de yeni tanımlanan bu grubun özelliklerini daha iyi tanımlayabilmek için yeni ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

Anahtar Sözcükler: DBBHL, EBER, Yaş, Bcl-2, Bcl-6, C-myc

ABSTRACT

Aim: Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) is a Non-Hodgkin lymphoma. The etiology is unknown. EBER (EBV RNA) presence is seen between 8-11% in DLBCL; have been found to be associated with more advanced age, more advanced disease, and anaplastic and plasmablastic subtypes of DLBCL. With the revision of the World Health Organization (WHO) of lymphoma classification in 2016; as EBV (+) DLBCL begins to appear in younger and in wider spectrum, the resulting new information has led to the change of "elderly" to "not otherwise specified (NOS)". The aim of this study is to demonstrate the immunophenotypic properties of DLBCL and to show whether the presence of EBER detected by chromogenic in situ hybridization (CISH) in these cases is related to the age and sex of the cases.

Materials and Methods: The pathology reports of 61 cases diagnosed as DLBCL between January 2015 and December 2016 from the Okmeydanı Education and Research Hospital, Medical Pathology Department of Health Sciences University were examined. All hematoxylin and eosin (H & E) stained, bcl-2, bcl-6 and c-myc immunohistochemically stained preparations and EBER ISH preparations were reevaluated. The relationship between EBER positivity and age, sex, bcl-2, bcl-6, c-myc staining percentages were investigated.

Results: EBER positivity was determined in four cases of DLBCL cases. The ages of these cases ranged from 34 to 78 years. Staining was observed in 3 cases under 50 years of age (mean age is 43,6) and 1 case in over 50 years. 3 cases of EBER positive cases were male and 1 female. Positive staining was observed in 85,3% (n=52) with bcl-2, 95,1% (n=58) with Bcl-6 and 90,2% with c-myc (n=55) in varying percentages. There was no statistically significant relationship between EBER positivity and age, gender, bcl-2, bcl-6 and c-myc expression.

Conclusion: 6.6% EBER positive cases were detected in the DLBCL cases studied. More positivity was seen in males than females. The mean age of EBV positive DLBCLs is similar to the data in the literature. We believe that new studies are needed to investigate the presence of EBER not only in elderly patients but also in all age groups of DLBCL, both in relation to immunophenotypic findings and in order to define the characteristics of this newly defined group.

Key Words: DLBCL, EBER, Age, Bcl-2, Bcl-6, C-myc

GİRİŞ

Diffüz büyük B hücreli lenfomalar (DBBHL), B hücre fenotipine sahip Non-Hodgkin lenfomaların (NHL) en sık görülen alt tipidir. DBBHL etiyojisi bilinmemektedir. Genellikle de novo ortaya çıkar ancak kronik lenfosittik lösemi/küçük lenfosittik lösemi, folliküler lenfoma, ya da marjinal zon lenfoma gibi daha düşük dereceli lenfomaların transformasyonu ile de görülebilir. Agresif gidişli olup, klinik, morfolojik, immünofenotipik ve sitogenetik olarak heterojen özellikte lenfomalardır. Bu heterojeniteden dolayı DBBHL'lar kendi içerisinde değişken klinik gidiş ve sağkalıma sahiptirler. DBBHL'larda prognoza etkili olabilecek fenotipik, klinik, immünohistokimyasal ve sitogenetik farklılıkların saptanması son yıllarda önem kazanmış araştırma konularındandır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile çeşitli immünohistokimyasal belirteçler ve moleküler teknikler kullanılarak DBBHL'ları alt gruplara ayırmak ve prognozla ilişkilerini ortaya koymak için çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Buna rağmen, birçok olgu biyolojik heterojenite nedeniyle kesin bir şekilde sınıflandırılmaz. Bu tür olgular, başka şekilde tanımlanmamış diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL, NOS) olarak sınıflandırılır.

Myc rearranjmanı DBBHL, NOS'ların %5-15'inde sıklıkla Bcl-2 ile, daha az sıklıkla Bcl-6 rearranjmanı ile ilişkilidir ve "çift vuruşlu" veya "üçlü vuruşlu" lenfoma olarak adlandırılmaktadır. Güncellenmiş sınıflamada da 'Yüksek dereceli lenfoma, myc ve bcl-2 ve/veya bcl-6 rearranjmanı ile birlikte' olarak yer almaktadır. Myc protein ekspresyonu DBBHL'da %30-50 oranında görülmekte; bu olguların %20-35'inde Bcl-2 ekspresyonu ile yüksek konkordansa sahiptir. Bu tümörlerin çoğu myc/Bcl-2 genetik değişikliklerini taşımamakta ve "çift ekspresyonlu lenfoma" olarak adlandırılmaktadır. Birçok çalışmada bu olguların DBBHL, NOS olgularına göre daha kötü gidişli olduğu, prognostik indikatör olarak düşünülebileceği belirtilmiş ancak DBBHL, NOS'tan ayrı bir kategoriye konulmamıştır.

EBER varlığı; DBBHL'larda %8-11 arasında görülmekle birlikte; sıklıkla daha ileri yaşla (60 yaş üzerinde), daha ileri evre hastalıkla ve DBBHL'nın anaplastik ve plazmablastik alt tipleriyle ilişkili bulunmuştur. Bu hastalarda tedavi yanıtı ve sağkalım sıklıkla; EBV RNA taşımayan olgulara göre daha düşük bulunmuştur.

2008 DSÖ lenfoma sınıflamasında yaşının EBV (+) DBBHL olarak yeni bir antite tanımlanmış bu antitenin 50 yaş üzerindeki hastalarla ve EBV pozitifliği ile ilişkisi bulunmuştur. DBBHL'nın bu alt tipinde EBV'nün tümör mikroçevre kompozisyonunda, anti-tümör yanıtını engellemede ve hastalığın progresyonunda rol alabileceği gösterilmiştir (1,2). EBV (+) DBBHL, EBV (+) B hücreli lenfoproliferatif hastalıklar olarak bilinen bir grup hastalığın monoklonal karşılığıdır. Çoğunlukla güney batı Asya'da özellikle Japonlarda görülmekle birlikte daha az sıklıkla Batı ülkelerinde de görülebilir. Bu hastalık yaşlanmayla ilişkili immün sisteminde gerilemesinden kaynaklanan, blastik, klonal B hücre proliferasyonudur (3,4). Erkekler kadınlardan daha fazla etkilenir. Lenf nodlarında ve ektranodal alanlarda (deri, gastrointestinal sistem, akciğer ve tonsil) izlenir. Olguların %50'den fazlasında B semptomları, yüksek LDH, ileri evre hastalık görülürken solid organ ve kemik iliği tutulumu rölatif olarak daha azdır.

EBV (+) DBBHL'nın morfolojik olarak polimorfik ve büyük hücreli olmak üzere iki tipi vardır ve iki morfoloji de aynı spesimende görülebilir. Baskın olan polimorfik alt tipidir ve polimorfik ve monomorfik immünoblast benzeri transforme hücreler, Hodgkin ve Reed-Sternberg benzeri hücreler görülür. Polimorfik alanlarda küçük lenfositler, plazma hücreleri, histiyositler de izlenir. Fokal nekroz alanları görülür.

Tümör hücreleri pan B hücreleri markerları ile pozitifdir ve germinal merkez dışı immün fenotip gösterir. CD30 olguların dörtte üçünde pozitifken CD15 negatiftir. EBV bütün olgularda pozitifdir ve en iyi CISH yöntemi ile EBER'in varlığının gösterilmesi ile tespit edilir (3).

EBV (+) DBBHL'nın daha genç yaşlarda ve daha geniş spektrumda görülmeye başlanması konusunda elde edilen yeni bilgiler ile 2016 yılında WHO lenfoma sınıflamasındaki revizyon sonucu isimlendirme "yaşlılığın" sözcüğü çıkarılarak "başka türlü sınıflandırılmayan (NOS)" olarak yeniden belirlenmiştir (5).

Literatürdeki bu bilgiler ışığında, bu çalışma; DBBHL'nın immünofenotipik özelliklerini ortaya koymanın yanı sıra; bu olgularda kromojenik in situ hibridizasyon (CISH) yöntemi ile saptanan EBER varlığının olguların yaş ve cinsiyetleri ile ilişkili olup olmadığını göstermeyi amaçlamaktadır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Mevcut çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurul'unun 20.12.2016 tarihli 562 dosya sayılı kararına göre etik açıdan uygun bulunmuştur.

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Bölümü'nün rapor arşivinden Ocak 2015-Aralık 2016 tarihleri arasında laboratuvara gönderilmiş doku örneklerinde (tru-cut, eksizyon, rezeksiyon materyali), DBBHL tanısı almış, 18-25 yaş aralığındaki 61 olgunun patoloji raporları incelendi. Bu olguların Hematoksilen & Eosin (H&E) boyalı, bcl-2, bcl-6 ve c-myc immünohistokimyasal boyalı preparatları ile EBER CISH bulunan çalışmasına ait preparatları patoloji arşivinden çıkarılarak tekrar değerlendirildi. Olguların demografik verilerine hastane otomasyon sisteminde ulaşıldı. Ulaşılan veriler ışığında hastaların cinsiyet, yaşı ve tanı aldığı bölgeler kaydedildi.

Çalışmamızda daha önceden Genemed marka Bcl-2-100 klon kullanılarak 1:100 konsantrasyonda immünohistokimyasal olarak boyanmış pozitif kontrollü preparatlar ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Sitoplazmik boyanma pozitif olarak kabul edildi. Her olguda boyanma yaygınlığının en yoğun olduğu alanlar tespit edilerek pozitif olanların yüzdesi hesaplandı ve %25'ten az boyanma bir pozitif (+), %25-50 arası boyanma iki pozitif (++), %50'den fazla boyanma üç pozitif (+++) olarak kabul edildi.

Biocare bcl-6 [LN22] kullanılarak 1:50 konsantrasyonda immünohistokimyasal olarak boyanmış pozitif kontrollü preparatlar ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Nükleer boyanma pozitif olarak kabul edildi. Her olguda boyanma yaygınlığının en yoğun olduğu alanlar tespit edilerek pozitif olanların yüzdesi hesaplandı ve %25'ten az boyanma bir pozitif (+), %25-50 arası boyanma iki pozitif (++), %50'den fazla boyanma üç pozitif (+++) olarak kabul edildi.

Çalışmamızda daha önceden Cell-Marque marka c-Myc [EP121] kullanılarak 1:100 konsantrasyonda boyanmış pozitif kontrollü preparatlar ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Nükleer boyanma pozitif olarak kabul edildi. Her olguda boyanma yaygınlığının en yoğun olduğu alanlar tespit edilerek pozitif olanların yüzdesi hesaplandı ve %25'ten az boyanma bir pozitif (+), %25-50 arası boyanma iki pozitif (++), %50'den fazla boyanma üç pozitif (+++) olarak kabul edildi.

Çalışmamızda daha önceden Bio-Care marka EBV01 klon kullanılarak uygulanan EBER in situ hibridizasyon çalışmasına ait pozitif kontrollü preparatlar ışık mikroskobu ile değerlendirildi. En az bir tümör hücresinde görülen koyu mavi/ siyah nükleer boyanma pozitif olarak kabul edildi.

İstatistiksel İncelemeler

İstatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) V21 2012 programı kullanıldı.

Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel yöntemlerin (Ortalama, Standart Sapma, Medyan, Frekans, Oran, Minimum, Maksimum) yanısıra niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Fisher Exact Ki Kare ile Ki Kare testi kullanıldı. Anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışma Ocak 2015-Aralık 2016 tarihleri arasında, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Bölümü'nde DBBHL lenfoma tanısı almış 61 olgu ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya, yaşları 31 ile 90 arasında değişen, ortalama yaşı 61 olan, 28 kadın, 33 erkek olgu alınmıştır. Olgular 50 yaş üstü ve 50 yaş altı olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Olguların %26'sı (n=16) 50 yaş altında, %74'ü (n=45) 50 yaş üstündedir.

Tümörün lokalizasyonu incelendiğinde %42,6 oranında (n=26) nodal, %57,4 (n=35) oranında ektranodal olarak saptanmıştır.

Bcl-2 ile %85,3 (n=52), bcl-6 ile %95,1 (n=58), c-myc ile %90,2 (n=55)'inde değişen yüzdelerde pozitif boyanma izlenmiştir.

IHK'sal olarak Bcl-2 ile %85,3 (n=52) oranında pozitif boyanma izlenmiş olup olguların %16,4 (n=10)'ünde %0-25 boyanma, %8,2 (n=5)'inde %25-50 boyanma, %60,7 (n=37)'inde >%50 sitoplazmik boyanma saptanırken %14,8 (n=9)'inde boyanma izlenmemiştir (Şekil 1).

IHK'sal olarak Bcl-6 ile %95,1 (n=58)'inde pozitif boyanma izlenmiş olup olguların %13,1 (n=8)'inde %0-25 boyanma, %29,5 (n=18)'inde %25-50 boyanma, %52,5 (n=32)'inde >%50 nükleer boyanma saptanırken %4,9 (n=3)'unda boyanma izlenmemiştir (Şekil 2).

IHK'sal olarak c-myc ile %90,2 (n=55)'inde pozitif boyanma izlenmiş olup olguların %37,7 (n=32)'ünde %0-25 boyanma, %31,1 (n=19)'inde %25-50 boyanma, %21,3 (n=13)'ünde >%50 nükleer boyanma saptanırken %9,8 (n=6)'inde boyanma izlenmemiştir (Şekil 3).

CISH yöntemi ile yapılan EBER boyanması ile %6,6 (n=4) olguda boyanma saptanırken, 57 (93,4) olguda boyanma izlenmemiştir (Şekil 4).

Yaş grupları arasında değerlendirilen değişkenler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$).

Cinsiyet grupları arasında değerlendirilen değişkenler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$).

EBER pozitifliğine göre değerlendirilen değişkenler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$) (Tablo I).

EBER pozitifliği görülen olguların yaşları 34 ile 78 arasında değişmekte olup ortalama yaş 57'dir.

Tablo I: EBER boyanmasına göre verilerin karşılaştırılması.

N:61		Negatif (n=57)	Pozitif (n=4)	X ²	p
		N (%)	N (%)		
^F Lokalizasyon	Nodal	24 (42,1)	2 (50,0)	0.095	1.000
	Ekstranodal	33 (57,9)	2 (50,0)		
^F Yaş Grubu	<50	13 (22,8)	3 (75,0)	5.262	0.052
	>50	44 (77,2)	1 (25,0)		
^F Cinsiyet	Kadın	27 (47,4)	1 (25,0)	0.753	0.618
	Erkek	30 (52,6)	3 (75,0)		
^F Bcl-2 İHK boyanması; n (%)	Negatif	7 (12,3)	2 (50,0)	3.415	0.223
	0-25 Boyanma	10 (17,5)	0 (0,0)		
	25-50 Boyanma	5 (8,8)	0 (0,0)		
	>50 Boyanma	35 (61,4)	2 (50,0)		
^F Bcl-6 İHK boyanması; n (%)	Negatif	3 (5,3)	0 (0,0)	2.593	0.547
	0-25 Boyanma	7 (12,3)	1 (25,0)		
	25-50 Boyanma	18 (31,6)	0 (0,0)		
	>50 Boyanma	29 (50,9)	3 (75,0)		
c-myc İHK boyanması; n (%)	Negatif	6 (10,5)	0 (0,0)	0.783	1.000
	0-25 Boyanma	21 (36,8)	2 (50,0)		
	25-50 Boyanma	18 (31,6)	1 (25,0)		
	>50 Boyanma	12 (21,1)	1 (25,0)		

Ki Kare, ^FFischer Exact Ki Kare, İHK: İmmünohistokimya, CISH: Kromojen in situ hibridizasyon.

Şekil 1: Bcl-2 immünohistokimyasal metod, sitoplazmik boyanma, %0-25, (A, x400), %25-50 boyanma, (B, x400), 0>%50 boyanma (C, x200).

Şekil 2: Bcl-6 immünohistokimyasal metod, nükleer boyanma, %0-25 boyanma, (A, x400), %25-50 boyanma, (B, x400), >%50 boyanma (C, x400).

Şekil 3: C-myc immünohistokimyasal metod, nükleer boyanma, %0-25 boyanma, (A, x400), %25-50 boyanma, (B, x400), >%50 boyanma (C, x400).

50 yaş altında 3 olguda, 50 yaş üstünde 1 olguda boyanma izlenmiştir. 50 yaş altındaki olguların ortalama yaşı 43,6'dır.

EBER pozitif olguların tümünde değişen yüzdelerde Bcl-6 ve c-myc ile boyanma izlenmiştir.

EBER pozitif olguların %50'sinde Bcl-2 ile pozitiflik görülmüştür.

TARTIŞMA

EBV herpes virüs ailesinden bir DNA virüsü olup ilk olarak 1964'te Burkitt lenfomada hücre kültüründe saptanmıştır (6). Çoğu kişi çocukluk ya da erken adölesan dönemde enfekte olur ve olguların %35-69'unda enfeksiyöz mononükleoza neden olur. EBV enfeksiyonu; Burkitt Lenfoma, plazmablastik

Şekil 4: CISH yöntemi ile olgularımızdaki EBER boyanma paterni, 1. olgu (A, x200), 2. olgu (B, x400), 3. olgu (C, x200), 4. olgu (D, x200).

lenfoma, NK/T hücreli lenfoma, anji-immünohistiyoblastik lenfoma, Hodgkin lenfoma, immünyetmezlik ilişkili lenfoproliferatif hastalık gibi birçok lenfoproliferatif hastalıkla da ilişkilidir (7).

EBV hem epitelyal hücreleri hem de lenfositleri enfekte eder, CD21 yüksek hafıza B hücrelerine karşı spesifik eğilimi vardır. Bu hücreler de latent enfeksiyon için viral rezervuar oluşturur. Latent viral antijenlerin ekspresyonuna bağlı olarak farklı B hücre diferansiasyon evrelerinde üç latent program ileri sürülmüştür. Bunlar, nativ B hücrelerinde latens tip III (büyüme programı), germinal merkez latens tip II (olağan program), hafıza B hücrelerinde latens tip I'dir (8).

Yaşlılığın EBV pozitif DBBHL'sı, 2008 yılında yayınlanan, WHO hematopoetik ve lenfoid doku tümörlerinin sınıflamasının dördüncü baskısında yeni bir antite olarak tanımlanmıştır. 50 yaşından büyük, öncesinde lenfoma öyküsü ve altta yatan immün yetmezliği olmayan hastalarda tanımlanmıştır. İleri evre hastalık ve ektranodal tutulum ile ilişkilidir (9). EBV pozitif DBBHL'nın daha genç yaşlarda ve daha geniş

spektrumda görülmeye başlanması sonucu oluşan yeni bilgiler ile bu antite 2016 yılında lenfoma sınıflamasındaki revizyon sonucu EBV (+) DBBHL, NOS olarak değiştirilmiştir (5).

EBV pozitif DBBHL'daki lenfomagenезisin mekanizması latent membran protein-1 (LMP-1) ve azalmış T hücre efektör yanıtı (immün yaşlanma) ile ilişkilidir. Ishtiaq ve ark. NHL'larda EBV frekansını %12,7 olarak bulmuşlar ve en sık diffüz büyük B hücreli lenfomada saptamışlardır. Diffüz büyük B hücreli lenfomalı 21 olgunun 4'ünü EBV pozitif olarak bulmuşlardır (10).

Genç yetişkinlerdeki EBV pozitif DBBHL için az sayıda çalışma bulunmaktadır. Hong ve ark. gençlerde görülen EBV pozitif DBBHL'nın, yaşlılığın EBV pozitif DBBHL ile karşılaştırıldığında farklı bir antite olduğunu, ayrı bir patogeneз ve davranış gösterdiğini belirtmişlerdir. Hong ve ark. genç yetişkinlerdeki lenfomagenезisin farklı bir mekanizma ile olabileceğini, klinik olarak ayrı antite olarak düşünülmesi gerektiğini belirtmişler; az sayıda olgu ile yaptıkları çalışmalarında 2 olguda kromozom

18'in kısa kolundaki kaybın sık olduğunu bulmuşlardır. Her ne kadar ön sonuçlar olsa da yaşlılardaki ve gençlerdeki EBV pozitif DBBHL'nın farklı genetik ve moleküler değişikliklerin araştırılması gerektiğinin üzerinde durmuşlardır (11). Cohen ve ark. bu antitenin sadece yaşlılarla sınırlandırılmayacağını, WHO sınıflamasında yaş sınırının revize edilmesini önermiştir (12). 2016 yılında da yapılan revizyon sonucu yaşlılığın terimi kaldırılmış, genç yaşlarda da görülebileceği belirtilmiştir.

Monabati ve ark. yaptığı çalışmada EBV pozitif DBBHL prevalansını %11,6 olarak belirtmiş olup, çalışmalarında 50 yaş üstündeki olgu sayısı 50 yaş altına göre daha fazla bulunmuştur. Genç yaş grubundaki ortalama yaş 41, yaşlı gruptaki ortalama yaş 66,25 olarak belirlenmiştir (7). Bizim çalışmamızda değerlendirdiğimiz DBBHL olgularında ortalama yaş 61 olup EBV pozitifliği görülme oranı % 6,6'dır. EBV pozitif olan olgulardaki ortalama yaş 57 olarak izlenmiştir. Çalışmaya 50 yaş altında 16 olgu, 50 yaş üstünde 45 olgu alınmıştır. 50 yaş altındaki grupta EBER üç olguda pozitif görülmüştür. Bu olguların ortalama yaşı 43,6'dır. Monabati ve ark. yaptığı çalışmaya yakın sonuç elde edilmiştir. 50 yaş üzerinde 78 yaşında bir olguda pozitiflik görülmüştür. Daha geniş serilerde yapılacak olan kapsamlı çalışmalar ile 50 yaş üzerindeki grupta da benzer sonuçlar elde edilebileceğini düşünüyoruz. EBV pozitif prevalansının da daha düşük görülmesi olgu sayısının kısıtlılığına bağlı olabilir.

Son zamanlarda GM üzerinde anahtar rol oynayan Bcl-6 üzerinde disregülasyona neden olan üç özel EBV ilişkili miRNA gösterilmiştir. EBV nedenli nükleer faktör-kB (NF-kB) yolağı aktivasyonu DBBHL hücrelerinin hayatta kalması için gerekli olabileceği; NF-kB'nın daha kötü gidişli olan DBBHL'nın post GM varyantında daha fazla ilişkili olabileceği öngörülmüştür. Buna ek olarak genetik faktörler EBV ilişkili lenfomaların gelişmesinde rol oynamaktadır (13). EBV pozitif lenfomalar bu nedenle genelde germinal merkez dışı immün fenotip gösterirler. Bcl-6 ve CD10 ile negatifken, MUM-1 ve CD30 eksprese ederler (14). Uccini ve ark. yaptığı çalışmada 7 pediatrik EBV pozitif DBBHL olgusunda tümü germinal merkez fenotipte bulunmuştur (15). GM ve GM dışı subtiplerdeki insidansın önemini tanımlamak için ileri çalışmalar gerekmektedir.

DBBHL'da çok sayıda sitogenetik translokasyonlar bulunmuştur. Bcl-2, Bcl-6 ve c-myc lokuslarını etkileyen translokasyonlar en sık görülür ve bu translokasyonların prognostik uyumluluğu tartışmalıdır. Bcl-2 gen reaarmanjmanı GM DBBHL ile ilişkili olup bu subtipde kötü prognostik faktördür. Bununla birlikte diğer çalışmalarda Bcl-2'nin prognostik önemi belirlenmemiştir. Bcl-6 translokasyonu GM dışı DBBHL subtipinde yüksek oranda görülür ancak sağkalım üzerindeki etkisini gösteren çalışmalar çelişkilidir. Myc translokasyonu DBBHL'da %5-10 arasında görülür. Yoğun tedavi gerektiren hasta seçimi için myc statüsü kritik faktördür. Son zamanlarda Myc proteinin N-terminalini hedef alan monoklonal antikor gösterilmiştir. Parafin gömülü

dokularda sensitif ve spesifik nükleer boyanma sağlar. Bu antikor ile myc translokasyonu olan DBBHL olgularının tanınabilir, İHK ile myc pozitif gelen DBBHL olgularının daha agresif tedavi almaları gerektiği şüphesini uyandırabilir (16).

Çalışmamızda c-myc antikorunun Bcl-2 ve Bcl-6 antikorları ile EBV pozitifliği arasındaki ilişkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda myc translokasyonu gösteren olgularda immünohistokimya ile %50'den fazla nükleer boyanma izlenmiştir (17). Bellas ve ark. da bu boyanma oranını temel alarak yaptıkları çalışmada %29 oranında boyanma izlemişlerdir. Çoğu çalışmada myc boyanma için kullanılan limit %40 oranındadır (18). Bizim çalışmamızda %50 oranındaki boyanma oranına baktığımızda olguların %21'inde boyanma izlenmiştir. Literatüre göre benzer boyanma görülen bu olguların myc gen değişiklikleri gösterebileceği ve agresif gidişli olabilecekleri için seçilip uygun agresif tedavi yöntemlerinin uygulanması gerekir.

Bellas ve ark. yaptığı çalışmada 100 DBBHL olgusunun, 20'sinde Bcl-2 translokasyonu saptanmış olup 62 olguda Bcl-2 protein ekspresyonu (E17 klonu) izlenmiştir. Klon 124 kullanıldığında pozitif olgu sayısı 77'ye yükselmiştir. Bcl-2 protein ekspresyonu translokasyon ve amplifikasyon ile uyumlu bulunmuştur. Bcl-2 translokasyonu ile GM fenotipi ile ilişkili iken; bcl-2 protein ekspresyonu ile hücre kökeni arasında korelasyon izlenmemiştir. Bcl-2 over ekspresyonu olguların yaklaşık %60'ında görülürken, sadece %15-20'sinde translokasyon görülmüştür. Bu da protein ekspresyonunda başka mekanizmalar olduğunu da göstermektedir (16). Bizim çalışmaya aldığımız olgularda Bcl-2 ekspresyonu değişen yüzdelerde %85,3 oranında izlenmiştir. Literatüre göre görülen bu fazla boyanma oranı kullanılan klon ile ilgili olabilir. Bellas ve ark. yaptığı çalışmasında %50'den fazla boyanmayı pozitif kabul ederek olguları değerlendirmişlerdir. Bizim çalışmamızın sonuçlarının Bellas ve ark. göre yüksek oranda görülmesi bizim seyrek hücre zayıf görülen boyanmaları da pozitif kabul etmemizden kaynaklandığını düşünüyoruz. Çalışmaya aldığımız olgularda, %50'den fazla sitoplazmik boyanma görülen olguların oranına baktığımızda sonuçlar literatür ile benzer nitelikte olup %60 oranındadır.

Myc ve bcl-2 ile koekspresyonu DBBHL olgularının risk gruplandırılmasında önemli bir araç olarak tanımlanmıştır (18). Myc ve Bcl-2 koekspresyonu sinerjistik bir etki yaratarak proliferasyonu artırıp apoptozun bloke olmasına neden olur bu da kötü gidişi artırır.

Bizim çalışmamızda 9 olguda bcl-2 ve myc ile %50'den fazla birlikte boyanma izlenmiştir. Bu olguların gen değişikliği gösterebileceğini ve yönden de araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Bcl-6 normal lenfoid dokuda germinal merkez hücreleri tarafından eksprese edilir. Naz ve ark. yaptığı çalışmada GM subtipinin %86'sında, GM dışı olguların %70'inde bcl-6 ile boyanma izlenmiştir (19). Bellas ve ark. yaptığı çalışmada 100

olgunun 52'sinde bcl-6 gen değişiklikleri izlenmiştir. Bu genetik değişiklikler 22 olguda translokasyon, 29 olguda amplifikasyon ile birlikte translokasyon, 30 olguda amplifikasyon şeklindedir. Bcl-6 protein ekspresyonu 63 olguda izlenmiştir. Bcl-6 translokasyonu ile protein ekspresyonu arasında ilişki bulunmamıştır (16). Bizim çalışmamızda ise bcl-6 protein ekspresyonu değişen yüzdelerde %95 oranında izlenmiştir.

Ziarkiewicz ve ark. yaptığı çalışmada EBV pozitif DBBHL'da tümör hücrelerinde azalmış bcl-6 ekspresyonu saptanmıştır. Çalışmadaki EBER pozitif olguların ortalama yaşı 57,9'dur (8). Bizim çalışmamızda EBER pozitif olguların tümünde bcl-6 ile değişen yüzdelerde pozitiflik görülmüştür. Daha geniş serilerle yapılacak kapsamlı çalışmalar literatür ile benzer sonuçlar gösterebilir.

Uccini ve ark. EBV pozitif DBBHL olan 7 pediatrik olguda myc ve bcl-2 statüsünü değerlendirmişlerdir. İki olguda bcl-2 ile %50'den fazla boyanma, myc ile 1 olguda %50'den fazla, 5 olguda %10-50 oranında boyanma izlemişlerdir. Çocuklarda görülen histolojik bulgular, polimorfik ve monomorfik patern, nekroz alanları, EBV ile enfekte tümör hücre oranı, germinal merkez dışı orijin, Bcl-2 ve myc translokasyonlarının olmayışı yaşlılarda görülenler ile benzerlik göstermektedir (15).

Bizim çalışmamızda 9 olguda bcl-2 ve myc ile %50'den fazla birlikte boyanma izlenmiş olup bu olgularda EBER negatif olarak bulunmuştur. EBER pozitif 2 olgumuzda bcl-2 ve c-myc ile %50'den fazla birlikte boyanma izlenmemiştir.

Bizim çalışmamızda DBBHL olgularında bcl-2, bcl-6 ve myc ile boyanma yüzdeleri ile EBV varlığı arasındaki ilişki olguların yaşına bakmaksızın saptanmaya çalışılmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu durumun olgu sayısının kısıtlılığı ile ilişkili olduğunu ve daha geniş serilerde yapılacak daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

SONUÇ

Çalışmamızın sonuçlarına göre EBER DBBHL olgularında %6,6 oranında saptanmıştır. Bu olguların yaşları 34 ile 78 arasında değişmekte olup ortalama yaş 57'dir. 50 yaş altında 3 olguda, 50 yaş üstünde 1 olguda boyanma izlenmiştir. 50 yaş altında pozitiflik görülen olguların ortalama yaşı 43,6'dır.

Erkeklerde kadınlara göre daha fazla pozitiflik görülmüştür.

Bcl-2 ile %85,3 (n=52), Bcl-6 ile %95,1 (n=58), c-myc ile %90,2 (n=55)'inde değişen yüzdelerde pozitif boyanma izlenmiştir.

EBER (+) olguların tümünde Bcl-6 ve c-myc ile değişen yüzdelerde pozitif boyanma izlenmiştir. Bcl-2 ile iki olguda pozitiflik izlenmiştir.

Dokuz olguda bcl-2 ve myc ile %50'den fazla birlikte boyanma izlenmiş olup bu olgularda EBER negatif olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda EBER varlığının yaş, cinsiyet, bcl-2, bcl-6 ve c-myc ekspresyonu ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durumun olgu sayısının kısıtlılığı ile ilişkili olduğunu ve daha geniş serilerde yapılacak daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Karube K, Campo E. MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas. *Semin Hematol.* 2015;52(2):97-106.
2. Cohen M, De Matteo E, Narbaitz M, Carreño FA, Preciado M V., Chabay PA. Epstein-Barr virus presence in pediatric diffuse large B-cell lymphoma reveals a particular association and latency patterns: Analysis of viral role in tumor microenvironment. *Int J Cancer.* 2013;132(7):1572-80.
3. Slack GW, Hsi ED, Gascoyne RD. Diffuse Aggressive B Cell Lymphomas. In Hsi ED, editör. *Hematopathology.* 2. baskı Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. s. 290-2.
4. Conkbakır Ö. Diffüz büyük B hücreli lenfomalarda sitogenetik olarak alt tiplerin ve bunların prognostik özelliklerinin araştırılması. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi;* 2013.
5. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016;127(20):2375-91.
6. Dunleavy K, Roschewski M, Wilson W. Lymphomatoid granulomatosis and other Epstein-Barr virus associated lymphoproliferative processes. *Curr Hematol Malig Rep.* 2012;7:208-15.
7. Monabati A, Vahedi A, Safaei A, Noori S, Mokhtari M, Vahedi L, et al. Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma: Is it different between over and under 50 years of age? *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2016;17(4):2285-9.
8. Ziarkiewicz M, Wolosz D, Dzieciatkowski T, Wilczek E, Dwilewicz-Trojaczek J, Jedrzejczak WW, et al. Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large B cell Lymphoma in the Experience of a Tertiary Medical Center in Poland. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2015;159-69.
9. Nakamura S, Jaffe ES, Swerdlow SH. EBV positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC; 2008. s. 243-4.
10. Ishtiaq S, Hassan U, Mushtaq S, Akhtar N. Determination of Frequency of Epstein-Barr Virus in Non-Hodgkin Lymphomas Using EBV Latent Membrane Protein 1 (EBVLMPI) Immunohistochemical Staining. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14:3963-7.
11. Hong JY, Yoon DH, Suh C, Huh J, Do IG, Sohn I, et al. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma in young adults: Is this a distinct disease entity? *Ann Oncol.* 2015;26(3):548-55.
12. Cohen M, Narbaitz M, Metrebian F, De Matteo E, Preciado MV, Chabay PA. Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma association is not only restricted to elderly patients. *Int J Cancer.* 2014;135:2816-24.

13. Castillo JJ, Beltran BE, Miranda RN, Paydas S, Winer ES, Butera JN. Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Elderly: What We Know So Far. *Oncologist* [Internet]. 2011;16(1):87-96. Tarihinde adresinden erişildi: <http://theoncologist.alphamedpress.org/cgi/doi/10.1634/theoncologist.2010-0213>
14. O'Malley DP, Auerbach A, Weiss LM. Practical Applications in Immunohistochemistry: Evaluation of Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Related Large B-Cell Lymphomas. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2015;139(9):1094-107. Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.archivesofpathology.org/doi/10.5858/arpa.2014-0451-CP>
15. Uccini S, Al-Jadiry MF, Scarpino S, Ferraro D, Alsaadawi AR, Al-Darraj AF, et al. Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma in children: A disease reminiscent of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Hum Pathol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;46(5):716-24. Tarihinde adresinden erişildi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2015.01.011>
16. Bellas C, Garcia D, Vicente Y, Kilany L, Abaira V, Navarro B. Immunohistochemical and Molecular Characteristics with Prognostic Significance in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *PLoS One*. 2014;9(6).
17. Kluk MJ, Ho C, Yu H, Chen BJ, Neuberg DS, Cin PD, et al. MYC Immunohistochemistry to Identify MYC-Driven B-Cell Lymphomas in Clinical Practice. *Am J Clin Pathol*. 2016;0:1-14.
18. Johnson N, Slack G, Savage K, Connors J, Ben Neriah S, Rogic, S et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;30(34):3452-9.
19. Naz E, Mirza T, Danish F. Clinicopathologic Evaluation of Subgroups of Diffuse Large B Cell Lymphoma by Immunohistochemistry. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2011;12:3335-9.