

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**FOLİKÜLER LENFOMALARIN VE YENİ TANIMLANMIŞ BCL-2 NEGATİF ALT  
GRUBUN EPHA7, EZH2 EKSPRESYONU VE *BCL2* "BREAK-APART"  
AÇISINDAN ANALİZİ, SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI VE  
HİSTOPATOLOJİK KORELASYONU**

**Dr. Aysun YEŞİLİRMAK**

**UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA  
2014**

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**FOLİKÜLER LENFOMALARIN VE YENİ TANIMLANMIŞ BCL-2 NEGATİF ALT  
GRUBUN EPHA7, EZH2 EKSPRESYONU VE *BCL2* "BREAK-APART"  
AÇISINDAN ANALİZİ, SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI VE  
HİSTOPATOLOJİK KORELASYONU**

**Dr. Aysun YEŞİLİRMAK**

**UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Emine Arzu AYHAN**

**ANKARA  
2014**

## TEŞEKKÜR

Bu araştırma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 014 D02 101 002 numaralı bilimsel araştırma projesi olarak desteklenmiştir.

Bu çalışmanın başından sonuna kadar arşivden preparatların ve blokların temininde emeği geçen ve beni hiç kırmayan Lokman Kale'ye, TMA bloklarımın hazırlanmasında ve kesilmesinde yardımları için Özlem Kalaycı'ya ve Aynur Işık'a, immünohistokimyasal boyama için kesitleri yapan ve FISH çalışmasının her aşamasında yanımda olan Rahime Çiçek'e, immünohistokimyasal boyamaları gerçekleştiren Murat Aytekin'e, Ziya Birinci'ye ve Şenay Korkmaz'a,

Çalışmamın istatistik danışmanlığını yapan Selçuk Korkmaz'a,

Tez danışmanım olmayı kabul ettiği, çalışmamı planladığı, sadece tez süresi boyunca değil, asistanlık dönemim boyunca her türlü sorunumu rahatlıkla danışabildiğim sevgili tez hocam E. Arzu Ayhan'a,

Her türlü problemime samimi bir şekilde çözüm bulan, bana patoloji hayatım boyunca hep destek olan, tez konusunda yardımlarını hiç bir zaman esirgemeyen sevgili hocam Ayşegül Üner'e,

Patoloji hayatına adım attığım ilk günden beri iyi bir patoloji eğitimi almamı önemseyen, bana patolojiyi sevdiğini ve akademik hayatta kendimi geliştirmemi teşvik edip destekleyen tüm hocalarıma,

Asistanlık eğitimim boyunca birlikte güzel anılar biriktirdiğimiz asistan arkadaşlarıma,

Sevgi dolu bir aile ortamında yetişmemi sağlayan, beni yetiştirmede özen ve hassasiyet gösteren benim fedakar anneme, babama ve ablama,

Son olarak hayatımda bana yaşattığı ilgi, güven ve sevilme duygusu yanında, gece-gündüz demeden benim her türlü sıkıntımı paylaşan, benim bugünlere gelmemdeki destek ve özveri için canım eşim Umut İsmail Yeşilirmak'a ve hayatımıza kattığı anlam için meleğim, bitanecik kızım Zeynep'e,

Tüm kalbimle teşekkür ederim.

## ÖZET

**Yeşilirmak A, Foliküler Lenfomaların ve Yeni Tanımlanmış BCL2 Negatif Alt Grubunun EPHA7, EZH2 Ekspresyonu ve BCL2 “break-apart” Açısından Analizi, Sonuçlarının Karşılaştırılması ve Histopatolojik Korelasyonu, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Tezi, Ankara, 2014.** Foliküler Lenfoma (FL) germinal merkez B hücrelerinden köken aldığı varyasyılan matür B hücreli bir lenfomadır ve Non-Hodgkin lenfomaların ikinci en sık tipidir. FL’ları iyileştirmek belirgin bir klinik problemdir, çünkü standart kemoterapi yaklaşımı ile tedavi edilemez olduğu düşünülmektedir. FL’nın son zamanlarda tanımlanan genetik lezyonları, potansiyel yeni ilaç tedavi seçenekleri oluşturmaktadır. Bu çalışmanın amacı kendi bölümümüzde FL tanısı almış hastaların doku örneklerinde hedefe yönelik tedavide gündeme gelecek olan BCL2, EPHA7 ve EZH2 ekspresyon durumunu incelemek, BCL2 negatif alt grubu tanımlamak ve bu grubun gerek bu belirteçler gerekse BCL2 break-apart açısından farklı olup olmadığını araştırmaktır. Bu çalışma kapsamında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı’nda 2000 – 2014 yılları arasında FL tanısı almış 98 hastanın 102 adet biyopsi örneği yeniden değerlendirilmiştir. Olguların %28,4’ü derece 1 FL, %39,2’si derece 2 FL ve %32,4’ü derece 1-2 FL tanısı almıştır. Hastaların klinik ve demografik verileri hasta veri tabanından elde edilmiştir. Yapılan incelemede biyopsi örneklerinde seçili temsili bloklardan elde edilen kesitlerde immünohistokimyasal yöntemle BCL2 klon 100/D5, BCL2 klon E17, BCL2 klon SP66, EZH2 ve EPHA7 ekspresyonuna bakılmıştır. Daha sonra BCL2 antikorumun herhangi biri ile negatif ya da parsiyel pozitif olan 40 olguya ait tümör materyalini içeren doku mikro-dizineri hazırlanmıştır. Bundan elde edilen kesitte in-situ hibridizasyon yöntemi ile BCL2 break-apart durumu araştırılmıştır. Kemik iliği tutulumu olmayan hastaların genel sağkalım sürelerinin tutulumu olan hastalara göre daha uzun olduğu görülmüştür. BCL2’nin farklı klonları ile BCL2 negatif FL oranının değişkenlik gösterdiği saptanmıştır (klon 100/D5 %21,6, klon E17 %14,7 ve klon SP66 %8,8). BCL2 klon SP66 fiksasyondan en az etkilenen ve en yüksek pozitiflik oranına sahip olan olarak ortaya çıkmıştır. FISH çalışılan örneklerden 27 tanesinden sonuç elde edilmiştir. Bu 27 örneğin hiçbirinde BCL2 break veya amplifikasyon saptanmamıştır. Bu durum BCL2 translokasyon sıklığının bizim vaka grubumuzda Batı toplumlarında bildirileninkinden daha az olabileceği olasılığını akla getirmektedir (bazı Asya toplumlarından bildirilen daha düşük oranlara benzer olarak). EZH2 immünohistokimyasal olarak çok yüksek oranda pozitif bulunmuştur (93/102 vaka, %91,2). EZH2 ile germinal merkezde bulunan sentrositlerin %80 kadarı, sentroblastların ise %40 kadarı nükleer pozitif boyanmıştır (Bu oranlar germinal merkez hücrelerinde beklenen Ki-67 değerinden daha yüksektir). Vakaların %14,7’sinde EPHA7 ile kayıp saptanmıştır (15/101 vaka). Hedefe yönelik tedaviler açısından EZH2 ve EPHA7 ekspresyonunun immünohistokimya gibi rutin bir yöntemle bakılabileceği, ayrıca ilerde hem prognostik hem de tedavi yönlendirici olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** Lenfoma, foliküler, BCL2, EZH2, EPHA7.

## ABSTRACT

**Yesilirmak A, Analysis of Follicular Lymphomas and the Newly Defined BCL2 Negative Subgroup with regard to EPHA7 and EZH2 Expression and BCL2 break-apart, Comparison of Results and Histopathological Correlation, Hacettepe University School of Medicine, Pathology Thesis, Ankara, 2014.** Follicular lymphoma (FL) is a mature B cell lymphoma thought to arise from germinal center B cells and is the second most common subtype of non-Hodgkin lymphoma (NHL). Cure of FL is a significant problem and in fact it is thought to be incurable with standart chemotherapy modality. The recently identified genetic lesion of FL, constitute potential new therapies against FL. The aim of this study to examine the immunohistochemical expression of BCL2, EZH2 and EPHA7 and define this BCL2 negative subgroup among our follicular lymphoma cases. In the scope of this study, 102 biopsy specimens from 98 patients diagnosed as FL in Hacettepe University Department of Pathology in 2000 – 2014, were re-evaluated. 28,4% of the cases were grade 1 FL, 39,2% were grade 2 FL and 32,4% were grade 1-2 FL. The clinical and demographic data of patients were obtained from our patients' database. The immunohistochemical study was performed on representative blocks of tissues for BCL2 clone 100/D5, BCL2 clone E17, BCL2 clone SP66, EZH2 ve EPHA7 expression levels. Later, tissue microarrays were prepared, containing tumor tissue samples of 40 cases which were seen to be negative or partially positive with either of the 3 BCL2 clones used. *BCL2* break-apart was investigated by in-situ hybridization on sections from the microarray. It was seen that patients with bone marrow involvement had a better prognosis than those without bone marrow involvement. BCL2 positivity was seen to differ with respect to the BCL2 clone used (clone 100/D5 21,6%, clone E17 14,7% and clone SP66 8,8%). BCL2 clone SP66 turned out to be the one with least negative results and least affected by poor fixation. None of the 27 cases in which FISH analysis gave results demonstrated breaks or amplification in *BCL2*. This could a result of lower frequency of BCL2 translocation in our case group than in those of Western population. EZH2 was found to be positive in 91.2% of the cases (93/102 cases) and EPHA7 loss was detected in 14.7% of the cases (15/101 cases). %80 of centrocytes and %40 of centroblasts in germinal centers are found to be nuclear positive with EZH2 (This rate is higher than expected Ki-67 levels in germinal centers). We thus came to the conclusion that immunohistochemistry of BCL2, EZH2 and EPHA7 may have a role in the future in directing targeted therapy of FL.

**Keywords:** Lymphoma, follicular, BCL2, EZH2, EPHA7.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	ix
TABLolar	x
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Epidemiyoloji	3
2.2 Tutulan Bölgeler	3
2.3 Klinik Özellikler	3
2.4 Morfoloji	4
2.4.1 Patern	4
2.4.2 Parsiyel Nodal Tutulum ve “İn Situ” Foliküler Lenfoma	5
2.4.3 Kemik İliği ve Kan	5
2.4.4 Sitoloji	6
2.4.5 Foliküler Lenfomaların Derecelendirmesi	7
2.5 Foliküler Lenfoma Patogenezi	10
2.5.1 Hücresel Köken	10
2.5.2 Genetik Lezyonlar	11
2.5.2.1 Sitogenetik Anomaliler ve Onkogenler	11
2.5.2.2. Moleküler Genetik	12
2.5.2.3. BCL2 Antikoru ve Klonları	13
2.6. İmmüfenotip	14
2.6.1. Lenfoma Hücrelerinin İmmüfenotipi	14
2.6.2. Reaktif “Bystander” Hücreler	17
2.7. Difüz Büyük B Hücreli Lenfomaya Transformasyon	17
2.8. Varyantları	19
2.8.1. Pediatrik Foliküler Lenfoma	19
2.8.2. Primer İntestinal Foliküler Lenfoma	20

2.8.3.	Diğer Ekstranodal Foliküler Lenfomalar ve Kemik İliği İnfiltrasyonu	20
2.8.4.	İntrafoliküler Neoplazi/"İn Situ" Foliküler Lenfoma	21
2.9.	Foliküler Lenfoma İmmünofenotipik Alt Grupları	21
2.10.	Prognoz ve Prediktif Faktörler	22
2.11.	EZH2	22
2.12.	EPHA7	23
2.13.	Tedavi	24
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1.	Olgu Seçimi	27
3.2.	Histomorfoloji	27
3.3.	İmmünohistokimya	28
3.3.1.	İmmünohistokimyanın Değerlendirmesi	29
3.4.	Doku Mikro Dizinlerinin Hazırlanması	30
3.5.	İn-Situ Hibridizasyon	31
3.6.	İstatistiksel Analiz	32
4.	BULGULAR	33
4.1.	Klinik Bulgular	33
4.2.	Morfolojik ve İmmünohistokiyasal Bulgular	35
4.2.1.	Kemik İliği Tutulumu	36
4.2.2.	BCL2	37
4.2.2.1.	BCL2 Klon 100/D5	37
4.2.2.2.	BCL2 Klon E17	38
4.2.2.3.	BCL2 Klon SP66	39
4.2.2.4.	BCL2 Son Durum	40
4.3.	Floresan İn-Situ Hibridizasyon Bulguları	41
4.3.1.	<i>BCL2</i> Geni Durumu	41
4.4.	EPHA7	44
4.5.	EZH2	46
5.	TARTIŞMA	49
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	55
	KAYNAKLAR	57
	EK (İncelenen Hastalara Ait Biyopsi Numaraları)	77

**KISALTMALAR**

DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
FL	: Foliküler Lenfoma
DBBHL	: Difüz Büyük B Hücreli Lenfoma
MHL	: Mantle Hücreli Lenfoma
NHL	: Non-Hodgkin Lenfoma
GM	: Germinal merkez
GMD	: Germinal merkez dışı
EPHA7	: Ephrin (EPH) reseptör A7
EZH2	: Enhancer of Zeste Homolog 2 (Drosophila)
BCL2	: B Cell Leukemia/Lymphoma 2
FISH	: Floresan İn-Situ Hibridizasyon
miRNA	: MicroRNA
IPI	: International Prognostic Index
FLIPI	: International Prognostic Index for FL
EBV	: Epstein Barr Virüs
CHOP	: Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine ve Prednisolone
TMA	: Doku Mikrodizini "Tissue Microarray"
BBA	: Büyük Büyütme Alanı
RT-PCR	: Real Time Polymerase Chain Reaction



## ŞEKİLLER

Şekil 2.1: Normal germinal merkez ve FL	4
Şekil 2.2: Kemik iliği infiltrasyonu	6
Şekil 2.3: Sitolojik özellikler	7
Şekil 2.4: FL'da derecelendirme	8
Şekil 2.5: FL ve DBBHL'ya transformasyon alanları	9
Şekil 2.6: İmmünohistokimyasal bulgular	15
Şekil 2.7: Normal germinal merkez ve FL'da BCL2 ekspresyonu	16
Şekil 3.1: İmmünohistokimyasal belirteçlerin boyanma paternleri	30
Şekil 3.2: İn-Situ Hibridizasyon çalışmasının görünümü	32
Şekil 4.1: Hastaların genel sağkalım eğrisi	35
Şekil 4.2: Hastaların kemik iliği tutulumu ile genel sağkalım eğrisi	36
Şekil 4.3: Foliküllerde BCL2 klon 100/D5 ekspresyonu	38
Şekil 4.4: Foliküllerde BCL2 klon E17 ekspresyonu	39
Şekil 4.5: Foliküllerde BCL2 klon SP66 ekspresyonu	40
Şekil 4.6: BCL2 gen lokusu intakt vakanın FISH görünümü	42
Şekil 4.7: Foliküllerde EPHA7 ekspresyonu	44
Şekil 4.8: Hastaların EPHA7 durumu ile genel sağkalım eğrisi	46
Şekil 4.9: EZH2 ekspresyon yoğunlukları	47

## TABLOLAR

Tablo 2.1: FL patern özellikleri	5
Tablo 2.2: FL derecelendirme sistemi	10
Tablo 2.3: Tanı anında FL'ların genetik alterasyonlarının bilinen hedefleri	13
Tablo 2.4: Foliküler Lenfomanın güncel ve acil tedavi seçeneklerinin özeti	26
Tablo 3.1: Kullanılan antikörlerin özellikleri	28
Tablo 4.1: Klinik özellikler	33
Tablo 4.2: Olguların sağkalım-ölüm durumları	34
Tablo 4.3: BCL2 antikoru ile kemik iliği tutulumu ilişkisi	37
Tablo 4.4: BCL2 klon 100/D5 ile BCL2 son durumun uyumluluk değerlendirilmesi	38
Tablo 4.5: BCL2 klon E17 ile BCL2 son durumun uyumluluk değerlendirilmesi	39
Tablo 4.6: BCL2 klon SP66 ile BCL2 son durumun uyumluluk değerlendirilmesi	40
Tablo 4.7: Her üç BCL2 antikoru ve son durumları	41
Tablo 4.8: BCL2 son durum ile <i>BCL2</i> Break-apart sonuçlarının karşılaştırılması	42
Tablo 4.9: <i>BCL2</i> Break-apart ile konsültasyon durumunun karşılaştırılması	43
Tablo 4.10: BCL2-negatif derece 1-2 FL'lı 7 hastanın klinik verileri	43
Tablo 4.11: BCL2 rutin klonu ile E17 ve SP66 klonlarının uyumluluk değerlendirilmesi	44
Tablo 4.12: BCL2 son durum ile EPHA7 karşılaştırması	45
Tablo 4.13: EPHA7 ile FL olgularında derece karşılaştırması	45
Tablo 4.14: EZH2 ile BCL2 son durum karşılaştırması	48
Tablo 4.15: EZH2 yoğunluk durumu ile BCL2 E17 ve SP66 klonlarının karşılaştırılması	48

## 1. GİRİŞ

Foliküler Lenfoma (FL) germinal merkez B hücrelerinden köken aldığı varyasyılan matür B hücreli bir lenfomadır. Foliküler Lenfomanın moleküler patogenezi karmaşık ve tam olarak anlaşılammıştır. Normal germinal merkez hücrelerinde eksprese olmayan anti-apoptotik bir protein olan BCL2 proteininin aberan ekspresyonu en önemli patogenetik mekanizma olarak bilinmektedir. Bu proteinin aberan ekspresyonu tüm FL'ların yaklaşık %85'inde söz konusu olup, genellikle BCL2 ve immünglobulin ağır-zincir genini ilgilendiren t(14;18)(q32;q21) translokasyonuna bağlıdır<sup>1</sup>.

Son zamanlarda FL'nın alt grupları tanımlanmaya başlanmıştır. Bunların içinde en önemlisi BCL2 negatif FL alt grubu olarak ortaya çıkmaktadır ve bu grup daha detaylı olarak incelenmeye başlanmıştır. FL'ların %15'inde BCL2 ekspresyonu görülmez. BCL2-negatif FL'lar patologlar arasında tanı zorluğu yaratmaktadır. Bu BCL2 negatif grubun bir kısmında t(14;18)(q32;q21) translokasyonu mevcuttur. Gerçek BCL2 negatif alt grup ise mevcut farklı BCL2 alt grupları ile negatif olup t(14;18)(q32;q21) translokasyonunu da içermemektedir, ancak morfolojik olarak foliküler lenfoma özellikleri göstermektedir.

Klinik olarak FL'lar, yavaş ancak progresyonla er geç agresif ve hızlı yayılan bir hastalık olan difüz büyük B hücreli lenfomaya gelişim gösterirler. BCL2'nin aberan ekspresyonu tümör gelişim veya progresyonu için yeterli değildir ve ek genetik olaylar ortaya çıkmaktadır. Bunlar arasında germinal merkez B hücrelerinde bulunan tümör süpresör olarak tanımlanan EPHA7'nin, 6q delesyonu ile ilişkili olarak kaybı<sup>8</sup> ve EZH2 mutasyonları yer almaktadır<sup>6,7</sup>.

EPHA7 ve EZH2 ajana yönelik tedavi seçenekleri olarak belirlemektedir ve yakın gelecekte foliküler lenfomanın tedavi seçenekleri arasında yer alacakları düşünülmektedir. Bununla birlikte bu belirteçlerle foliküler lenfoma vakaları üzerinde yapılmış çalışmalar çok sınırlıdır.

Bu araştırmada 2000 – 2014 tarihleri arasında Hacettepe Ü. Tıp Fak. Patoloji Anabilim Dalı'nda raporlanmış foliküler lenfoma tanısı almış lenf nodu eksizyon materyallerinin klinikopatolojik analizi gerçekleştirildi. Bu FL'ları hedefe yönelik tedavide potansiyeli olan EPHA7 ve EZH2 ekspresyonu açısından incelemeyi, BCL2

negatif alt grubu tanımlamayı ve bu grubun bu belirteçler açısından farklı olup olmadığını ortaya koymayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

Bu kısımda non-Hodgkin lenfomalar içerisinde sınıflanan foliküler lenfoma (FL) ile ilgili genel bilgiler aktarılacaktır.

### 2.1 Epidemiyoloji

Foliküler lenfomalar Amerika Birleşik Devletleri ve Batı Avrupa'da yüksek insidansa sahip olup tüm lenfomaların %20'sini oluşturmaktadır. Doğu Avrupa, Asya ve gelişmekte olan ülkelerde insidansı daha düşüktür<sup>1</sup>. Ortalama yaşı 6. dekat olan erişkinleri ağırlıklı olarak etkiler, E/K oranı: 1/1.7 olarak hesaplanmıştır<sup>2</sup>. FL nadir olarak 20 yaşın altında görülebilmektedir, pediatrik hastalarda sıklıkla erkek cinsiyet baskındır<sup>3-6</sup>.

### 2.2 Tutulan Bölgeler

Foliküler lenfoma ağırlıklı olarak lenf nodunu tutar, ancak dalak, kemik iliği (Kİ), periferik kan ve Waldeyer halkasını da tutabilir. Hematopoetik sistem dışı ektranodal bölgelerden gastrointestinal sistem (GİS) ve yumuşak dokuda yaygın nodal hastalık ile birlikte tespit edilebilir. FL arada sırada primer olarak ektranodal bölgelerde de görülebilir; bunlar içinde gastrointestinal sistem (özellikle duodenum), lakrimal bez, meme ve testis sayılabilir<sup>7</sup>.

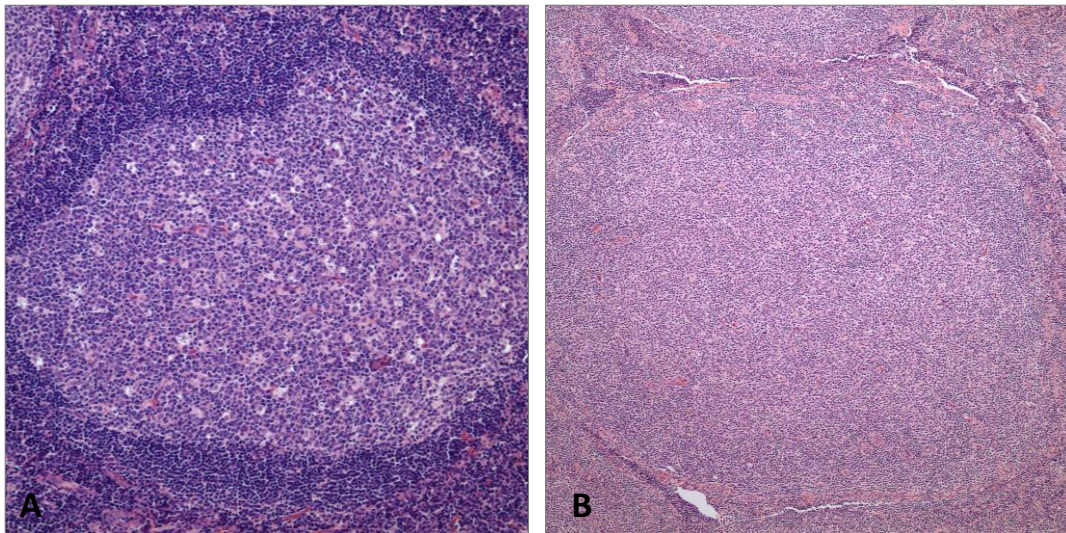
### 2.3 Klinik Özellikler

Çoğu hastada tanı anında yaygın hastalık mevcuttur; bunlar periferik ve santral (abdominal ve torasik) lenfadenopati ve splenomegalidir. %40-70 hastada kemik iliği tutulumu olur. Tanı anında sadece 1/3 hasta Evre I ya da II olarak karşımıza çıkmaktadır<sup>2</sup>. Yaygın hastalığa rağmen lenfadenopati dışında hastalar asemptomatiktir.

## 2.4 Morfoloji

### 2.4.1 Patern

FL vakalarının çoğunda nodal arkitektürü bozan sıkıca paketlenmiş neoplastik foliküllerden oluşan nodüler patern baskındır. Özellikle mezenterik ve retroperitoneal alanlarda skleroz sıktır. Neoplastik foliküller çoğunlukla atipik görünümündedir ve genellikle “mantle zonlar” incelmış ya da yok olmuştur. Reaktif germinal merkezlerde, farklı zonlara ayrılmış olarak yer alan sentroblast ve sentrositler FL’da rastgele dağılırlar, ki bu durum polarite kaybı olarak tanımlanır. Benzer şekilde reaktif germinal merkezleri karakterize eden “tingible body” makrofajlar FL’da genellikle bulunmaz. Bazı vakalarda foliküller büyük, düzensiz ve serpijinöz olabilir, difüz patern izlenimi yaratabilir. Foliküler dendritik hücre (FDH) boyaları olan CD21 ve CD23 bu tür foliküller ile difüz alanları birbirinden ayırt etmek için gerekli olabilir. Neoplastik hücrelerin interfoliküler dağılımı sıktır, ancak bu durum difüz paterni meydana getirmez. Bu interfoliküler neoplastik hücreler sıklıkla germinal merkezdekilerden küçük, nükleer konturları daha az düzensiz ve germinal merkez hücrelerinden farklı immünofenotip gösteren sentrositlerdir<sup>8</sup>.



**Şekil 2.1:** Normal germinal merkez ve FL. A) Reaktif germinal merkezde “tingible body” makrofajlar, polarite ve belirgin mantle zon varlığı. B) FL’da germinal merkezde izlenen mantle zon, “tingible body” makrofaj ve polarite kaybı (A ve B; H&E, 200x).

Bir difüz alan, CD21+/CD23+ FDH ile tanımlanan folikülleri oluşturan nodüleritenin seçilmediği alan olarak tanımlanır. Baskın olarak sentrositlerden oluşan difüz alanlar klinik olarak önemli değildir. Bununla birlikte, FL’da herhangi bir derecede tamamen ya da baskın büyük blastik/transforme hücrelerden oluşan difüz alanların varlığı, difüz büyük B hücreli lenfomaya eşdeğerdir ve bu durumda difüz büyük B hücreli lenfoma tanısının rapora eklenmesi gerekmektedir<sup>9</sup>. Buna karşın sadece az sayıda sentroblastın olduğu sentrositlerden baskın (derece 1-2) difüz alanların önemi klinik olarak belirsizdir, bu durumda foliküler ve difüz alanların göreceli oranını vermek tavsiye edilmektedir. Patoloji raporunda foliküler (>%75 foliküler), foliküler ve difüz (%25-75 foliküler) veya fokal foliküler/difüz baskın (<%25 foliküler) gibi not edilmelidir (Tablo 2.1)<sup>9</sup>.

**Tablo 2.1:** FL patern özellikleri.

Patern Raporlaması	Folikül Oranı
Foliküler	>%75
Foliküler ve difüz	%25-%75
Fokal foliküler	<%25
Difüz	%0

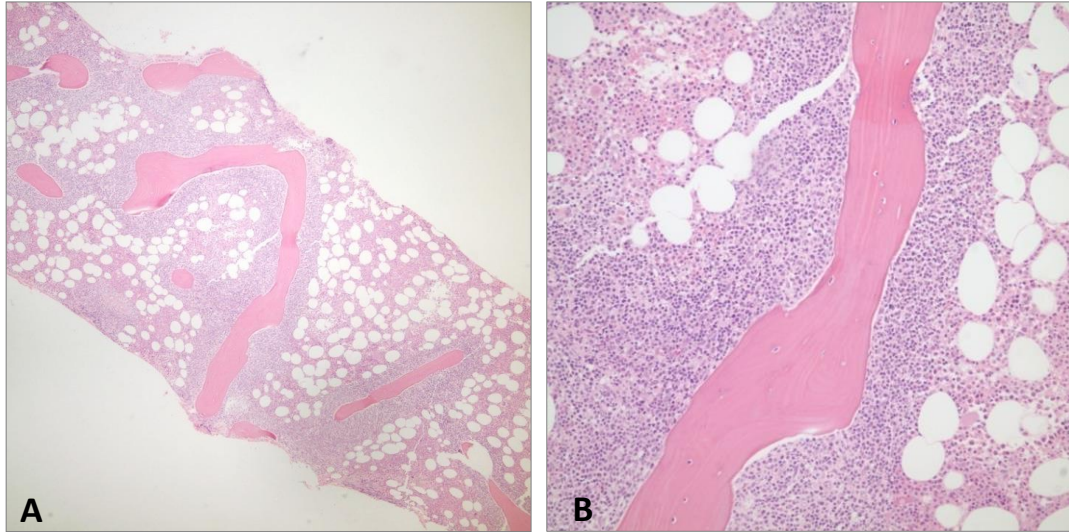
#### 2.4.2 Parsiyel Nodal Tutulum ve “İn Situ” Foliküler Lenfoma

Neoplastik olmayan foliküller, tipik foliküler lenfoma nodülleri beraberinde parsiyel tutulum gösteren lenf nodlarında bulunabilir ve bu durum tanı anında düşük derecede olabileceğini tahmin ettirebilir<sup>10</sup>. Ayrıca FL alanları içeren lenf nodlarında, FL tutulumuna komşu lenf nodlarında veya nadiren başka bir yerde foliküler lenfoması olsun ya da olmasın hastaların izole lenf nodlarındaki neoplastik olmayan foliküller, FL hücreleri ile parsiyel olarak kolonize olabilir. Bu durum “in situ” foliküler lenfoma olarak isimlendirilir<sup>11</sup>.

#### 2.4.3 Kemik İliği ve Kan

Kemik iliğinde, FL karakteristik olarak paratrabeküler alanda lokalizedir ve interstisyel alanın içine doğru yayılabilir. Foliküler dendritik hücre ağı ile karakterize foliküler gelişim paterni nadirdir, ama görülebilir. Tümör hücrelerinin morfolojisi en

çok lenf nodunun neoplastik interfoliküler hücrelerine benzer. Bu benzer hücreler periferik kanda da görülebilir<sup>7</sup>.



**Şekil 2.2:** Kemik iliği infiltrasyonu. A) Küçük büyütmede genel görünüm, karakteristik paratrabeküler infiltrasyon (H&E, 40x). B) Paratrabeküler alanda neoplastik interfoliküler hücrelere benzer infiltrasyon (H&E, 100x).

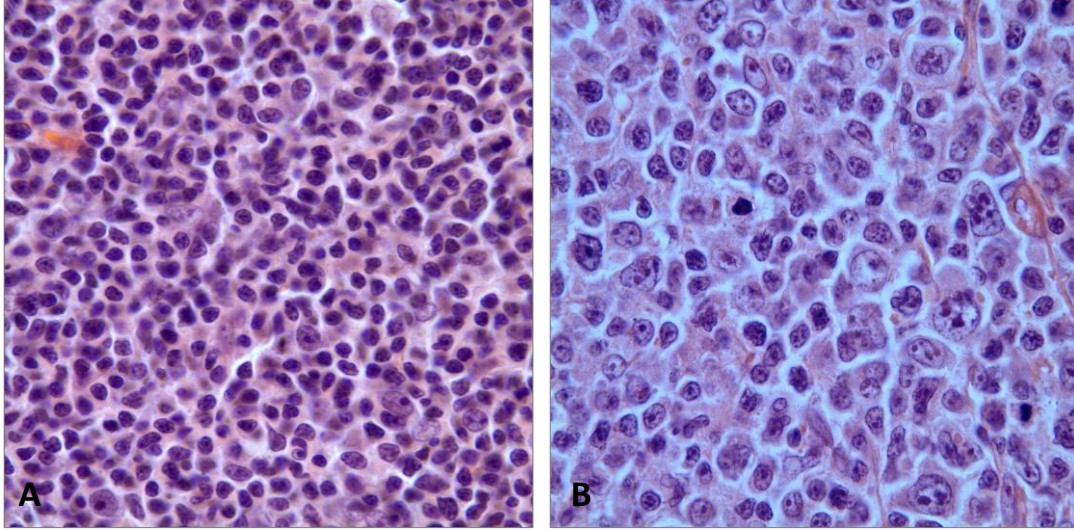
#### 2.4.4 Sitoloji

FL tipik olarak normal germinal merkezlerde bulunan iki tip B hücrelerinden oluşur. Köşeli, ince uzun, kıvrımlı veya yarıklı küçük-orta boyutta nükleuslu, belli belirsiz nükleollü ve dar soluk sitoplazmalı hücreler sentrosit olarak tanımlanır. Büyük hücreler genellikle yuvarlak veya ovaldir, ama arada sırada girintili ya da multilobüle nükleuslu olabilirler. Bu hücreler veziküler kromatinli, 1'den 3'e kadar periferik nükleol içeren ve sitoplazmaları dar olan sentroblastlardır, seyrek vakada kromatini çok dağınık ve lenfoblast benzeri görünümde nükleus görülebilir. Tipik olarak bunlar lenfositlerden en az 3 kat daha büyüktür, ama bazı vakalarda daha küçük olabilirler. Sentrosit baskın çoğu vakada, sentroblastlar her zaman bulunur, ama genellikle azınlık şeklindedir. Bu nedenle çoğu vaka reaktif foliküllere kıyasla daha monomorfik görünümündedir. Vakadan vakaya sentroblast sayısı değişir ve derecelendirmenin temeli de budur.

FL'ların %10'u kadarında, marjinal zon odakları veya monositoid görünümde B hücre farklılaşması olabilir, bu odaklar tipik olarak neoplastik foliküllerin



periferindedir<sup>12-14</sup>. Bu hücreler neoplastik klonun bir parçasıdır<sup>15</sup>. Plazmasitik diferansiyasyon belirgin olabilir ve taşlı yüzük hücreleri ayrıca görünebilir.



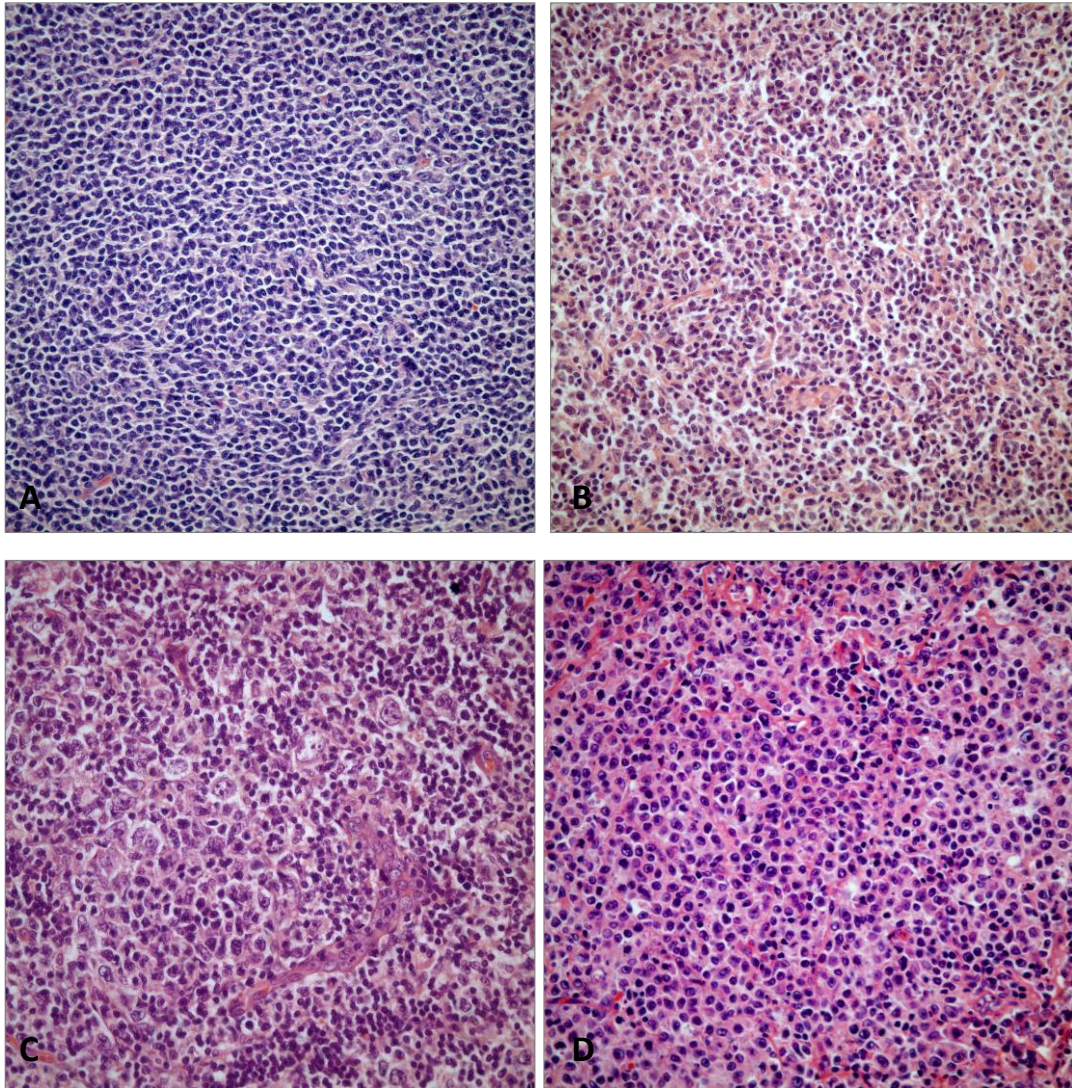
**Şekil 2.3:** Sitolojik özellikler. A) Dar soluk sitoplazmalı, yarıklı küçük-orta boyutta nükleuslu, belli belirsiz nükleollü hücreler sentrositler (H&E, 400x). B) Sitoplazmaları dar kenarlı, veziküler kromatinli, periferik nükleol içeren hücreler sentroblastlar (H&E, 1000x).

#### 2.4.5 Foliküler Lenfomaların Derecelendirmesi

FL büyük hücrelerin (sentroblast) oranına göre birçok sınıflandırma içinde derecelendirilir<sup>16-18</sup>. DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) üçüncü baskısı ve birkaç çalışma bu histolojik derecelendirmenin klinik gidişatı öngörebildiğini desteklemektedir. Örneğin büyük hücrelerin çok olduğu vakada daha agresif davranış olur ve bu vakaların difüz büyük hücreli lenfomaya transforme olma ihtimali yüksektir<sup>16, 19-26</sup>. Buna karşın derecelendirme için gerekli optimal metod ve derecelendirmenin klinik önemi tartışmalıdır ve yüksek tekrarlanabilirliğin olduğu bir metod yoktur<sup>27-29</sup>.

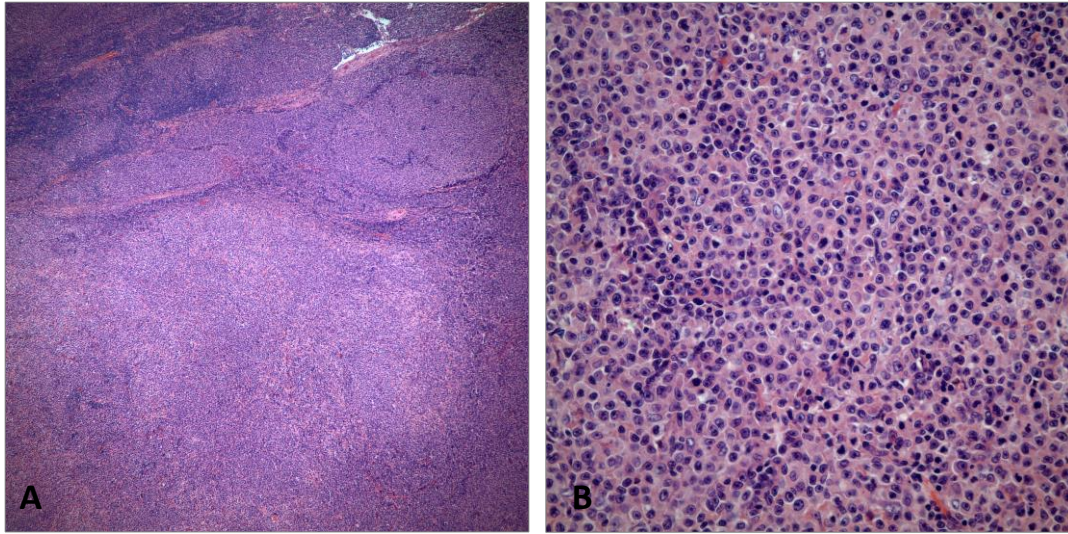
DSÖ 3. baskısında Mann ve Berard tarafından büyük transforme hücrelerin (sentroblastlar) sayısının baz alındığı 3 basamaklı derecelendirme sistemi en sık kullanılan metoddur<sup>29, 30</sup>. Derece 1 ve 2 arasında klinik olarak anlamlı farklılık olmadığından, bu ikisinin düşük dereceli olarak birleştirilebileceği önerilmektedir. Derece 3 ise kendi içinde 3A ve 3B olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Ancak derece 3A ve 3B vakalar arasında önemli klinik ve biyolojik farklılıkların olup olmadığının kanıtları halen tartışmalıdır<sup>31-33</sup>.

FL derecelendirmesinde, her 40x mikroskopik büyütme alanında, 10 adet neoplastik folikül içerisindeki ortalama sentroblast (büyük ya da küçük) sayısı esas alınır<sup>29, 30</sup>. En az 10 büyük büyütme alanında (BBA) değerlendirilen farklı foliküller; temsili foliküller olmalı, çoğu büyük hücre olanlardan seçilmelidir. Derece 1 ve 2 vakalarda sentrositler belirgin baskın ve sadece birkaç sentroblast vardır (derece 1 = 0-5 sentroblast/BBA, derece 2 = 6-15 sentroblast/BBA). Derece 3 vakalar >15 sentroblast/BBA bulunur. Derece 3 vakalar sentrosit oranına göre bölünmüştür. Derece 3B olanlarda foliküller tümüyle tabakalar halindeki blastik hücrelerden (sentroblast veya immünoblast) oluşmakta iken, derece 3A'da blastik hücreler arasında halen sentrositler bulunur (Tablo 2.2).



**Şekil 2.4:** FL'da derecelendirme. A) Derece 1. B) Derece 2. C) Derece 3A. D) Derece 3B (A, B, C ve D; H&E, 400x).

Eğer derece 3 foliküler lenfoma olan biyopsi materyali, farklı bölgelerinde derece 1-2 FL alanları içeriyor ise derece 3 FL tanısı olmalı, ama her derece ayrı ayrı belirtilmelidir. Foliküller arasında hem patern hem derece değişikliği olduğundan dolayı, lenf nodu yeterince örneklenmelidir. FL içinde herhangi bir difüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL) alanı bulunuyor ise, tahmini DBBHL ve FL oranları esas tanıda belirtilmelidir.



**Şekil 2.5:** FL ve DBBHL'ya transformasyon alanları. A) Derece 3B FL'da folliküllerin bir kısmı tabakalar halinde (H&E, 40x). B) Tabakalar halinde difüz blastik hücre infiltrasyonu (H&E, 400x).

Foliküler lenfomaların büyük çoğunluğu derece 1-2 (%80-90) olanlardır. Pediatrik vakalar daha çok derece 3 olurlar<sup>3, 4, 34, 35</sup>. Sadece birkaç çalışmada derece 3A ve 3B vakaların sıklığı karşılaştırılmıştır. Bu yayınlanan çalışmalarda<sup>31, 32, 36</sup>, derece 3 FL vakalarının bütün folikülleri arasında, derece 3B vakaların oranı %20-25'dir. Derece 3B vakaların %60-80 kadarında DBBHL alanları bulunur ve derece 3A'nın bulunma sıklığı daha azdır<sup>31, 36</sup>.

**Tablo 2.2:** FL derecelendirme sistemi.

Derecelendirme	Tanımlama
Derece 1-2 (düşük dereceli)	0-15 sentroblast
1	0-5 sentroblast
2	6-15 sentroblast
Derece 3	>15 sentroblast
3A	Sentrosit bulunur
3B	Solid sentroblast adaları

## 2.5 Foliküler Lenfoma Patogenezi

### 2.5.1 Hücresel Köken

Foliküler Lenfoma, matür B hücreli bir lenfomadır ve folikül merkez (germinal merkez) B hücrelerinden (tipik olarak hem sentrosit hem de sentroblastlar/büyük transforme hücreler) köken aldığı varsayılmaktadır<sup>7</sup>.

FL'nın hücresel kökeninin hipotezi aşağıda belirtilen gözlemlere dayanmaktadır:

- I. Reaktif germinal merkez ve malign foliküller arasındaki yapısal benzerlik
- II. İn vitro deneylerde hücresel farklılaşma ile reaktif germinal merkez içindeki sentrosit ve sentroblastlara benzer hücrelerin açığa çıkması
- III. İmmünofenotipik olarak antijen ekspresyonu ile germinal merkez (GM) hücrelerinin fenotipi arasındaki benzerlik

FL çoğunlukla reaktif folikülleri taklit eder ve foliküler paternde gelişim gösterir. Neoplastik foliküller monomorfik ya da değişken boyut ve şekildedirler. Grade 3B FL'lar hariç, B hücreleri sentroblast ve sentrositlerin karışımından oluşurlar.

Reaktif folikül ve FL arasındaki farklılık, rölatif olarak içerdikleri hücre tipi ve immünofenotiptir. Giemsa boyamasında sentroblastlar, belirgin bazofilik sitoplazmalı büyük hücrelerdir. Nükleusları çekirdek zarına yakın yerleşmiş birkaç nükleol içermektedir. Sentrositler sentroblastlardan daha küçüktür ve dar çember şeklinde sitoplazmaları vardır. Kromatin paterni sentroblastta göre daha yoğun, ancak lenfositten daha az koyudur. Foliküller, bu hücrelere ek olarak lenfosit, plazma hücresi, foliküler dendritik hücre, makrofaj ve nadir immünoblast içermektedir. FL'da

foliküllerde kompartman ayrımı yoktur, ancak koyu alanlarda sentroblastlar, açık alanlarda öncelikle sentrosit, sonra T hücreleri ve foliküler dendritik hücreler saptanmıştır. Yıldızlı gökyüzü manzarası oluşturan makrofajlar reaktif GM'e göre daha az sıklıkta bulunur.

FL alt gruplarından %8 kadarında foliküler gelişim paterni kısmi ya da tamamen silinebilir. FL hücreleri folikül dışına çıkıp interfoliküler alana kadar yayılmaktadır. Bu interfoliküler lenfoma komponenti folikül içindeki hücrelerden morfolojik olarak ayrılmaktadır<sup>37</sup>.

## 2.5.2 Genetik Lezyonlar

Foliküler Lenfomanın hücre kökeninin GM hücreleri olduğu bir kaç moleküler çalışmayla doğrulanmıştır; bunlar GM-spesifik gen ekspresyonu<sup>38</sup> ve devam eden somatik hipermutasyonlara benzer GM-spesifik genetik gelişimlerdir<sup>39</sup>.

### 2.5.2.1 Sitogenetik Anomaliler

FL genetik olarak t(14;18)(q32;q21) translokasyonu ve *BCL2* gen rearanjmanı ile karakterizedir. Bu translokasyon *BCL2* geninin immunoglobulin ağır zincirinin promotörünün kontrolü altına girmesine neden olur ve böylelikle ekspresyonu artar. İmmünglobulin hafif zincir genlerini ilgilendiren alternatif *BCL2* translokasyonu varlığı da rapor edilmiştir. Derece 1-2 FL'ların %90'ından fazlasında bu t(14;18) bulunur<sup>40</sup>, ama bu oran kullanılan tekniğe bağlıdır<sup>41</sup>. FISH en sensitif ve spesifik metod gibi görünmektedir<sup>42</sup>. *BCL2* rearanjmanı derece 3B FL'larda daha az sıklıktadır<sup>43</sup>. Coğrafik olarak da *BCL2* rearanjmanı %52 ile %88 arasında değişmektedir<sup>44-47</sup>. Asya popülasyonunda *BCL2* rearanjman sıklığı Batı'dakinden daha düşük olup, %58,5 olarak saptanmıştır<sup>48</sup>. Bu *BCL2/IGH* rearanjmanı sağlıklı vericilerin %25-75'inde periferik kanda bulunur ve özellikle RT-PCR (real time polymerase chain reaction) ile reaktif lenf nodlarında da saptanabilir<sup>49</sup>. 3q27 anomalisi ve/veya *BCL6* rearanjmanı FL'in %5-15'inde bulunur ve en sık derece 3B vakalarda olur. Ayrıca DBBHL'dakine benzer *BCL6* rearanjmanına sahip DBBHL ile ilişkili derece 3B FL'lar da raporlanmıştır<sup>43, 50</sup>.

t(14;18)'a ek olarak, FL'ların %90'ında diğer genetik alterasyonlar bulunur ve en sık olarak 1p, 6q, 10q ve 17p kaybı ve kromozom 1, 6p, 7, 8, 12q, X ve 18q/dup

çoğalmasını içerirler<sup>51, 52</sup>. Histolojik derece ve transformasyon ile ek alterasyonların sayısı artmaktadır<sup>53</sup>.

### 2.5.2.2 Moleküler Genetik

Kanserin moleküler patogenezi başarılı tedavilere yol açmaktadır. Yeni teknolojik ilerleme, kanser hücrelerindeki genetik ve epigenetik değişiklikler genomu bir uçtan bir uca kadar araştırmaya geniş ölçüde olanak sağlamaktadır<sup>54</sup>.

FL'ları iyileştirmek belirgin bir klinik problemdir, NHL'lar arasında en sık olan bu neoplazmın standart kemoterapi yaklaşımı ile tedavi edilemez olduğu düşünülmektedir<sup>55</sup>. Klinik olarak FL'lar, yavaş ancak süregelen progresyon ile, er geç agresif ve hızlı yayılan bir hastalık olan DBBHL'ya gelişim gösterirler.

Genetik olarak FL'lar antiapoptotik BCL2 proteininin ekspresyonunda artışa yol açan t(14;18)(q32;q21) translokasyonu ile karakterizedir. GM B hücrelerindeki BCL2 ekspresyonunun, FL'nın başlangıçta saptanan bir anomalisi olduğu düşünülmektedir. BCL2 artışı tümör gelişim veya progresyonu için yeterli değildir ve ek genetik olayları gerektirir<sup>56</sup>. FL'ların tekrarlayan lezyonları *c-MYC* amplifikasyonu, *p53* kaybı ve sıklıkla kromozom 6q'nun büyük segmentini etkileyen delesyonları içerirler. Bu değişiklikler ayrıca agresif hastalığın erken transformasyonu ve hasta surviyinin kısılması ile ilişkilidir<sup>52, 57, 58</sup>. Ayrıca kromozom 6q delesyonu diğer lenfoid kanserlerde de görülür, mesela; DBBHL'larda 6q delesyonunun hedeflendiği tanımlanmıştır. FL'lardaki 6q delesyonunun moleküler olayları ve genetik hedefleri henüz netleşmemiştir<sup>59</sup>.

Germinal merkezden köken alan lenfomaların histon-modifikasyon genlerinin sık mutasyonu ile karakterize olduğu gösterilmiştir. Özellikle foliküler lenfomalarda *MLL2* (%89,0) ve *EZH2* (%7,2) histon metiltransferaz, *CREBBP* (%32,6), *EP300* (%8,7) ve *MEF2B* (%15,3) histonasetilaz tekrar eden mutasyonlara sahip genler olarak rapor edilmiştir<sup>60-63</sup> (Tablo 2.3). Genom yanısıra epigenomların benzer hasarı foliküler lenfomalarda bu mutasyonların yüksek sıklığı ile açıklanmaktadır<sup>60, 64-66</sup>.

**Tablo 2.3:** Tanı anında FL'ların genetik alterasyonlarının bilinen hedefleri.

Gen	Sıklık (%)	Etkisi
<i>BCL2</i>	85 96	<i>IGH/BCL2</i> translokasyonu ile <i>BCL2</i> aşırı ekspresyonu "Bystander" mutasyonlar (SHM)?*
<i>MLL2</i>	89	Histon modifikasyon
<i>IGHV, IGHL</i>	79-100	N-glikozilasyon motifi
<i>EPHA7</i>	70	Tümör süpresör kaybı (ERK ve SRC kinaz sinyal iletimi)
<i>BCL6</i>	47 6-14	"Bystander" mutasyonlar (SHM)?* <i>BCL6</i> translokasyonu ile <i>BCL6</i> aşırı ekspresyonu
<i>TNFRSF14</i>	18-46	Bilinmiyor
<i>CREBBP</i>	33	Histon modifikasyon
<i>MEF2B</i>	15	Histon modifikasyon
<i>EP300</i>	9	Histon modifikasyon
<i>EZH2</i>	7	Onkogenik H3K27me3
<i>TNFAIP3/A20</i>	2-26	Tümör süpresör kaybı
<i>FAS</i>	6	Apoptoz azalması
<i>TP53</i>	<5	Tümör süpresör kaybı

\*SHM, somatik hipermutasyon.

Gen ekspresyon profil çalışmaları, FL'nın prognozu, gelişimi ve patogeneğinde mikroçevrenin önemini göstermektedir<sup>67</sup>. Gen ekspresyon profil çalışmaları t(14;18) pozitif vakaların germinal merkez B hücrelerine benzer bir profil sergilediklerini, t(14;18) negatif vakaların ise aktive B hücre benzeri profilleri de içerdiğini göstermiştir<sup>68</sup>. microRNA (miRNA) çalışmaları da bu iki grubun bazı miRNA ekspresyonları açısından da değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur<sup>69</sup>. Bu çalışmalarla t(14;18) negatif grubun geç germinal merkez B hücrelerinden köken almış olabileceğini, t(14;18) pozitif vakaların ise daha erken dönem germinal merkez B hücrelerinden köken almış olabileceğini öne sürmektedir. t(14;18) pozitif ve negatif vakalar arasında klinik gidişat olarak anlamlı bir fark olup olmadığı henüz bilinmemektedir<sup>70-75</sup>.

### 2.5.2.3 BCL2 Antikoru ve Klonları

Geçtiğimiz yıllarda, t(14;18)(q32;q21) translokasyonu FISH ile gösterilmiş olmasına rağmen, immünohistokimyasal olarak BCL2 negatif olan bazı foliküler lenfomalar raporlanmıştır<sup>76</sup>. t(14;18) translokasyonu pozitif bu vakaların bir kısmında BCL2 proteininin yalancı negatifliğine neden olan *BCL2* "missense" mutasyonu

taşıdığı gösterilmiştir. Bu yalancı negatiflik standart BCL2 antikorunun (klon 100/D5) bağlanmasını engelleyen yapısal protein modifikasyonu sonucunda oluşur<sup>77, 78</sup>. Son zamanlarda BCL2 proteininin farklı kısımlarına ulaşabilen iki yeni antikor tanımlandı, bunlar klon E17 ve SP66 içeren BCL2 antikorlarıdır<sup>79</sup>. Böylelikle gerçek BCL2 negatif grubun daha iyi tanımlanabildiği ve immünohistokimya ile t(14;18) negatifliğinin daha iyi öngörülebildiği gösterildi<sup>79</sup>.

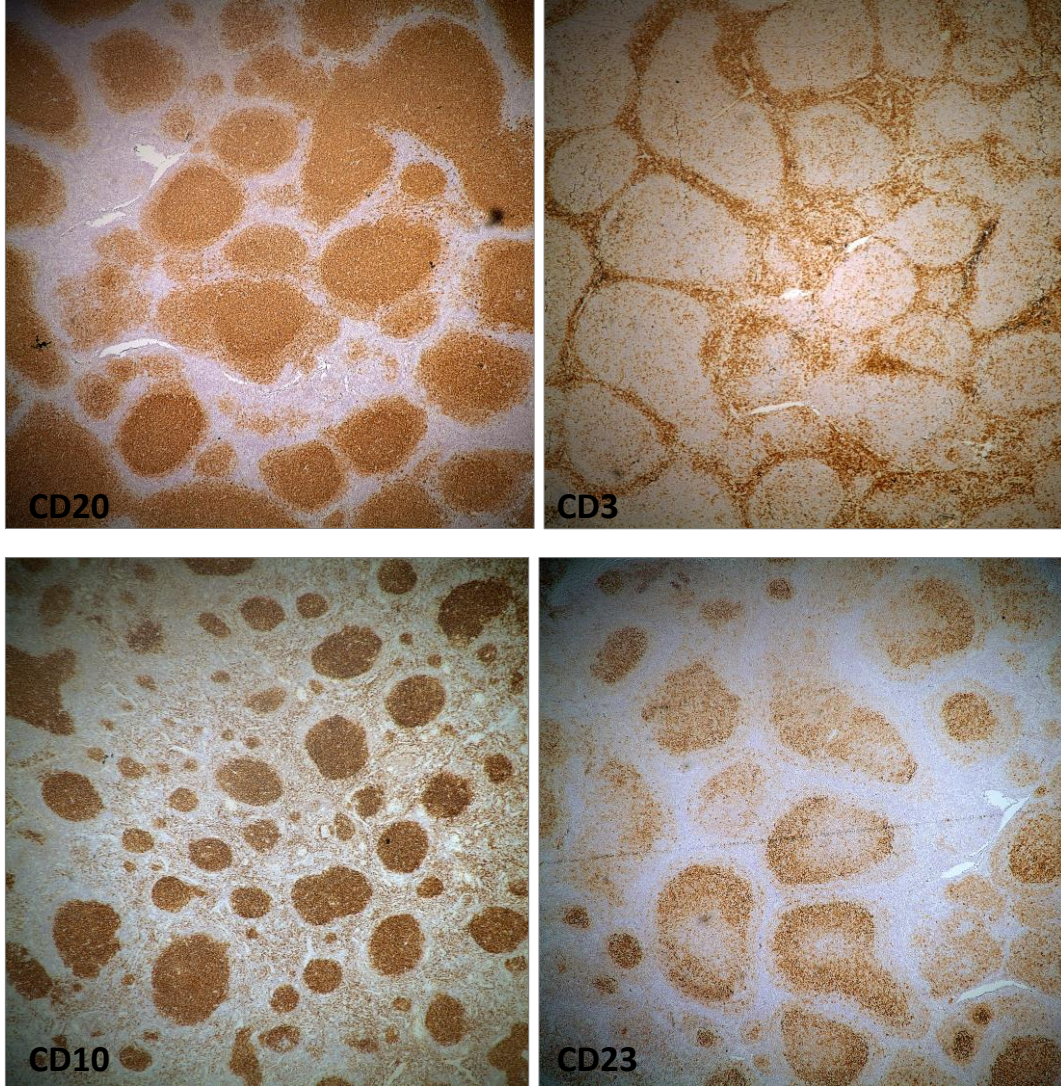
## 2.6 İmmünofenotip

### 2.6.1 Lenfoma Hücrelerinin İmmünofenotipi

Tümör hücreleri genellikle yüzey immünglobulin (Ig) pozitif olurlar, bunlar IgM pozitif ya da negatif, IgD, IgG ve nadiren IgA'da pozitif olabilir<sup>7</sup>. Matür B hücreli bir lenfoma olan FL, B hücre tümör belirleyicilerini eksprese eder: CD20, CD19, CD22, CD79a ve PAX-5 gibi. Tanı anında FL'lar genellikle CD20 pozitiflerdir. Anti-CD20 antikorunu kullanarak yapılan immünokemoterapi sonrasında, ilaç muhtemel bağlanma bölgesini işgal ettiğinden dolayı, ilaç uygulanmasından sonraki süresi belirsiz bir periyotta CD20 ekspresyonu tespit edilemez. Bundan dolayı CD20 ekspresyonu anti-CD20 tedavisi sonrası FL'larda genellikle kaybolur ve CD20 ekspresyonunun kalıcı kaybı yüksek dereceli lenfomaya transformasyon ile ilişkilidir<sup>80</sup>. FL'larda germinal merkez (GM) kökenini gösteren bazı GM antijenleri ile pozitif reaksiyon saptanmıştır, bunlar: CD10, BCL6, CD38 (zayıf), LMO2, AID, GCET1 ve CXCR4 tümör belirleyicileridir. Ancak CD10 ve BCL6 tanı desteği için en çok kullanılanlardır<sup>37</sup>. CD5, CD43 ve cyclin D1 negatiftirler. Bazı vakalarda, özellikle derece 3B olanlarda ve t(14;18)-negatif vakalarda, CD10 bulunmamaktadır, ancak BCL6 ekspresyonu devam etmektedir<sup>33, 43, 81-84</sup>. Derece 1-2 FL'ların %90'dan fazlası CD10 eksprese ederler ve ekspresyon sıklığı difüz FL'da %85<sup>85</sup>, t(14;18)-negatif FL'da %68<sup>86</sup> ve derece 3B FL'da %30'dur<sup>87</sup>. CD10 ekspresyonu sıklıkla interfoliküler neoplastik hücrelere göre foliküllerde daha kuvvetlidir ancak marjinal bölge farklılaşması gösteren alanlar yanı sıra interfoliküler komponentte bulunmayabilir<sup>88, 89</sup>. BCL6 interfoliküler alanlarda sıklıkla baskılanır. IRF4/MUM1 tipik olarak FL'da olmaz. Derece 3B baskın nadir vakalarda, CD10 negatif FL'da IRF4/MUM1 ekspresyonu tanımlanmıştır ve bu vakalarda BCL2 rearanjmanı



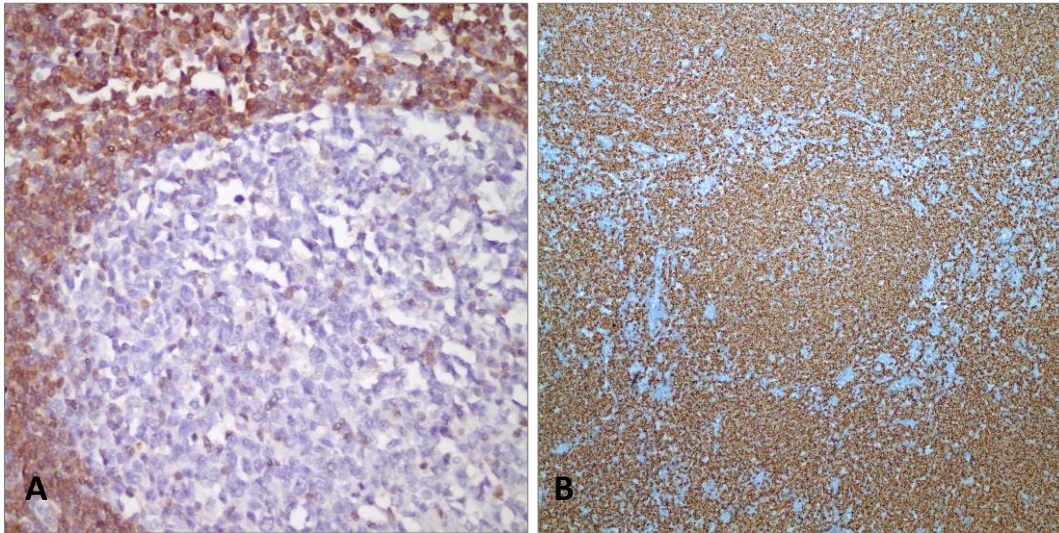
saptanmamıştır; %59 kadarı DBBHL ile ilişkilidir<sup>82</sup>. Foliküler alanlarda foliküler dendritik hücre ağı bulunur<sup>90</sup>; normal folikülden daha aralıklı olur, değişken CD21 ve CD23 ekspresyonu gösterirler, bu nedenle FDH ağını ortaya çıkarmak için her iki antijenin antikoruna ihtiyaç vardır.



**Şekil 2.6:** İmmünohistokimyasal bulgular. A) Neoplastik hücrelerde difüz CD20 ekspresyonu (İHK, anti CD20 Ab, 40x). B) İnterfoliküler alanda T hücrelerinde CD3 ekspresyonu (İHK, anti CD3 ab, 40x). C) Neoplastik hücrelerde difüz CD10 ekspresyonu (İHK, anti CD10 ab, 40x). D) CD23 ile pozitif foliküler dendritik hücre ağı (İHK, anti CD23 ab, 40x).

Foliküler lenfomaların çoğu sitoplazmik BCL2 eksprese ederler. Bu durum translokasyon t(14;18)(q32;q21) olanlarda daha sık saptanır, ancak translokasyon her zaman BCL2 protein ekspresyonuna yol açmaz<sup>37</sup>. Kullanılan standart antikorlarla

BCL2 proteini, neoplastik hücrelerde değişik oranlarda eksprese olur, derece 1 ve derece 2 FL vakaların %85-90'ında, ama derece 3 FL'ların sadece %50'sinde eksprese olur<sup>91</sup>. Bu ekspresyon oranındaki farklılık, en sık kullanılan antikörlerin tanıdığı epitoplara karşı geliştirilmiş antikör kombinasyonları kullanılarak BCL2 negatif vaka grubu daraltılabilir. BCL2 protein ekspresyonunun saptanması önemlidir çünkü, CD10 ekspresyonu veya foliküler yapıdaki sentrosit ve sentroblast morfolojisi ile tanınan GM hücrelerinde BCL2'nin ekspresyonunun mevcut olması malign folikülleri tanımda majör kriterdir<sup>37</sup>. BCL2 proteini reaktif folikülü neoplastik olandan ayırmak için kullanılabilir, buna rağmen BCL2 protein yokluğu tanıyı dışlamaz. BCL2 proteini "in situ" FL tanısı için şarttır; bu vakalar ve foliküllerin parsiyel tutulduğu vakalarda, sıklıkla tipik neoplastik foliküllerden daha çok, kuvvetli BCL2 ekspresyonu olur. BCL2 proteini, düşük dereceli B hücreli lenfomanın diğer tiplerinden FL'yı ayırmada yardımcı değildir, bunların çoğunda BCL2 ekspresyonu olur. BCL2 immünboymasının yorumlanmasında, germinal merkez içerisindeki T hücreleri ve primer foliküldeki mantle zonların normal olarak bu proteini eksprese ettiğini bilmek gerekir<sup>7</sup>.



**Şekil 2.7:** Normal germinal merkez ile FL'da BCL2 ekspresyonu. A) Normal germinal merkez BCL2 negatifliği (İHK, anti BCL2 ab, 400x). B) Foliküler lenfomada BCL2 pozitifliği (İHK, anti BCL2 ab, 100x).

BCL2-negatif FL'lar patologlar için tanı zorluğu yaratmaktadır. Bu vakalarda morfolojik destek önemlidir. BCL2-negatif FL'larda, sentroblast içeriği azalmış, folikülde kompartmanlaşma kaybı olmuştur, bu Ki-67 boyaması ile vurgulanabilir.

İnterfoliküler alana doğru CD10 pozitif hücrelerin genişlemesi malign folikülü tanımaya yardımcıdır. Bu tanısal özellikler floresan in situ hibridizasyon ve klonalite analizi ile tamamlanabilir.

FL'larda EBV tanımlanmamıştır<sup>37</sup>.

Foliküler lenfomada proliferasyon indeksi histolojik derecelendirme ile koreledir; derece 3 vakaların çoğu %20'nin üzerinde proliferasyon indeksine sahipken, çoğu derece 1-2 vakalar %20'nin altında proliferasyon indeksine sahiptir. Bununla birlikte çalışmalar arasında kayda değer varyasyonlar vardır ve bu durum muhtemel immünboyamadaki tekniğe ait farklılıklardan dolayıdır<sup>25, 43, 93</sup>. Yüksek proliferatif indekse sahip morfolojik olarak düşük dereceli FL alt grupları<sup>94, 95</sup>, düşük proliferasyon indeksine sahip olanlara göre ve derece 3 FL'lara benzer şekilde daha agresif davranış gösterirler<sup>95</sup>. Ki-67 boyaması bu nedenle histolojik derecelendirmeye yardımcı olarak kullanılabilir, ancak bu kullanım rutin değildir.

### 2.6.2 Reaktif “Bystander” Hücreler

FL, T hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücrelerden oluşan reaktif immünolojik zemini belirgin olan bir B hücreli lenfomadır. Bu “bystander” hücreler tanıya yardımcıdır ve lenfomaların biyolojik davranışına etki eder. Çoğu “bystander” hücre CD3 boyası ile tanınabilen T hücreleridir. Bunların da çoğu, foliküler T yardımcı hücre altkümüsi olarak tanımlanan özelleşmiş T hücrelerine aittir. Bu T hücre immünofenotipini tanımlayan belirleyiciler CXCL13, CD3, CD4, CD10, CD57 ve PD1'dir. Bu foliküler T yardımcı hücreler CD4 pozitif T hücre kökeninin bir parçasıdır, ama tümörün daha küçük bir alanında, CD8 pozitif sitotoksik veya düzenleyici T hücrelerini içeren diğer T hücre alt grupları da tanımlanabilir. Foliküler lenfomadaki “bystander” hücre popülasyona ek olarak mast hücreleri ve plazmasitoid dendritik hücreler (CD123 boyası ile tanınabilir) de bulunur<sup>37</sup>.

## 2.7 Difüz Büyük B Hücreli Lenfomaya Transformasyon

Düşük dereceli non-Hodgkin B hücreli lenfomaların doğal seyrinde sistemik tedavi ya da radyoterapi tedavisini takiben uzun vadede tekrarlayan nüksler görülür<sup>96</sup>. Hastaların bir grubunda ise düşük dereceli B hücreli lenfomanın agresif

lenfomaya histolojik transformasyonu görülür. Foliküler lenfomanın difüz büyük B hücreli lenfomaya transformasyonu en sık karşılaşılan ve en iyi tanımlanan transformasyon örneklerindedir. Transforme FL'nin prognozu, düşük evrede rahatsızlığı olan hastalar dışında kötüdür.

FL'nin DBBHL veya Burkitt/Burkitt-benzeri morfoloji gösteren hastalıklara transformasyonu evrensel olarak kabul edilmektedir.

Foliküler lenfomada histolojik transformasyon (HT) sıklığı günümüz tedavi modaliteleri ile tam olarak bilinmemektedir. Foliküler lenfomalı hastalardan oluşan iki seride HT olasılığı 5 yılda %17 ile %22 ve 10 yılda %28 ile %31 arasındadır<sup>97, 98</sup>. Başka bir çalışmada FL içinde HT olasılığı 7 yıllık takiplerde ortalama %20 olarak raporlanmıştır<sup>99</sup>.

Transformasyon tanısı DBBHL'ya veya Burkitt-benzeri lenfomaya histolojik transformasyon yanı sıra en az iki defa normal limitin üstündeki laktat dehidrogenaz (LDH) seviyesinin aniden yükselmesi, klinik ya da radyolojik olarak saptanan lokalize nodal gelişimin hızlı olması, yeni B semptomları veya yeni hiperkalsemi gelişiminden oluşan klinik kriterler esasına dayalı da konur. Bu anlamda FL'nin daha difüz ve agresif fenotipe transformasyon insidansı 10 yıllık takiplerinde %20 ile %30 arasındadır<sup>97, 98, 100, 101</sup>. Transformasyonun otopsi serilerinde raporlanma oranı %70'in üstündedir<sup>102</sup>.

Transformasyon için risk faktörleri (FL'ların tanı anındaki HT gelişimi için):

- I. Evre 3 ya da 4 hastalık<sup>98</sup>
- II. Serum LDH düzeylerinin yüksek olması<sup>98</sup>
- III. Beta-2 mikroglobulin seviyesinin >3 mg/L<sup>97</sup>
- IV. Serum albumin <3,5 g/dL<sup>97</sup>
- V. Derece 3 histoloji
- VI. Yüksek FLIPI veya IPI<sup>98</sup>

Transformasyondaki potansiyel mekanizma, FL hücrelerinden daha agresif bir subklonunun ortaya çıkmasını ya da ata öncül hücreden iki tümör popülasyonunun farklı gelişimini içerir<sup>103, 104</sup>. Bu transformasyondan tek bir sitogenetik anomali sorumlu değildir, HT'da sıklıkla ek genetik anomaliler görülmektedir. FL'dan DBBHL transforme olan vakaların çoğu klonal olarak ilişkilidir<sup>105</sup>. FL'da çok sayıda tesadüfi

olmayan sekonder genetik anomaliler tanımlanmıştır<sup>106, 107</sup>. HT' u takiben orijinal FL ve DBBHL'nin hemen tümünde *BCL2/IGH* rearanjmanı devam etmektedir<sup>108</sup>. HT'da spesifik genetik lezyonlar tanımlanmış olup<sup>109</sup> bunlar proliferasyonu, hücre siklus kontrolünü ve hücre ölüm programını regüle eden genetik alterasyonları içermektedir<sup>110</sup>. Transforme FL vakalarının %26 ile %80 kadarında *TP53* mutasyonu raporlanmıştır<sup>53, 111</sup>.

Transforme FL'lı hastaların prognozu kötüdür. FL tipik olarak yavaş bir klinik gidişata sahiptir ve ortalama sağ kalım tanıdan sonra 7 ile 10 yıl kadardır, CHOP gibi (Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine and Prednisolone) konvansiyonel kemoterapi ile tedavi edilen transforme hastaların takibinde veya diğer benzer antrasiklin içeren rejimlerde ise sağ kalım süresinin ortalaması 7 ile 20 ay aralığındadır<sup>97, 98, 100, 112</sup>.

## 2.8 Varyantları

### 2.8.1 Pediatrik Foliküler Lenfoma

Foliküler lenfoma 18 yaşın altındaki çocuklarda nadir görülen bir hastalıktır. Görüldüğü zamanda spesifik klinik, morfolojik, immünohistokimyasal ve genetik özellikler gösterirler<sup>37</sup>. Çocuklardaki FL'lar, sıklıkla servikal lenf nodlarını, diğer periferik lenf nodlarını veya Waldeyer halkasını kapsar; bununla birlikte iyi tanımlanmış testisin foliküler lenfoması yanısıra diğer ektranodal tutulumlar da ortaya çıkabilir. FL'sı olan çocuklar tipik olarak erken evre hastalığa sahiptir<sup>113-115</sup>. Pediatrik FL'ların bazı özellikleri erişkinde görülenden ayırt edilemezken, lokalize oluşları, *BCL2* protein ekspresyonu göstermemeleri, t(14;18) yokluğu ve derece 3 olma oranları erişkinlerdekine göre anlamlı olarak yüksektir<sup>114, 116</sup>. Özellikle *BCL2* ekspresyonu göstermemeleri nedeniyle pediatrik FL'ların reaktif lenfoid hiperplaziden ayrımı zor olabilir. Pediatrik FL'daki foliküller genellikle büyük, genişlemiş, birleşmiş ve bazen floral patern biçiminde olabilir. Doku arkitektürü bozulmuş ve malign foliküllerde kompartmantelizasyon kaybolmuştur. Sentroblast içeriği genellikle bu FL'da yüksektir, çoğu derece 3A veya 3B FL'dır. Pediatrik FL vakalarının 1/3'ü kadarı, tanı anında görülen eşzamanlı DBBHL komponenti içerir. Ancak DBBHL komponenti olsa dahi tedaviye yanıtı iyidir, progresif ve agresif

davranış gösteren transforme yetişkin tip FL'dan farklı olarak hastalısız sağ kalım %90'ın üzerindedir<sup>113-115</sup>. Pediatrik FL'da klonal immünglobulin ağır-zincir rearanjmanı saptanabilir, ama malignitenin kesin kanıtı olarak kullanılmamalıdır, çünkü B hücrelerinin klonal ekspresyonu benign immün reaksiyonlarda da tespit edilebilir. İmmünglobulin ağır-zinciri etkileyen kromozomal aberasyonlar ve *BCL6* aberasyonu<sup>117</sup> sıklıkla bulunur. Buna karşın, *BCL2* genini etkileyen translokasyonlar ve t(14;18) translokasyonu 18 yaşından önce hemen hemen bulunmaz, bu nedenle pediatrik FL'lar sadece klinikopatolojik olarak değil, biyolojik olarak da farklı bir FL varyantıdır<sup>117, 118</sup>.

### 2.8.2 Primer İntestinal Foliküler Lenfoma

Gastrointestinal sistemde bulunan primer foliküler lenfoma vakalarının çoğu ince bağırsakta görülür ve sıklıkla duodenumdadır<sup>119-121</sup>. Duodenal foliküler lenfoma, duodenumun ikinci kısmında baskın olarak bulunur<sup>122</sup>, çok sayıda küçük poliplerle birlikte ve sıklıkla, diğer hastalıklar nedeni ile yapılan endoskopide insidental olarak saptanırlar. Morfolojik, immünfenotipik ve genetik özellikleri nodal foliküler lenfomalara benzerdir. Çoğu hasta lokalize hastalığa sahiptir (evre IE ya da IIE) ve tedavi olmadan bile surviyi mükemmeldir.

### 2.8.3 Diğer Ekstranodal Foliküler Lenfomalar ve Kemik İliği İnfiltrasyonu

Foliküler lenfomalar ekstranodal olarak hemen her yerde görülebilir<sup>123</sup>. Bu bölgelerin bir kısmının, morfolojik, immünfenotipik ve genetik özellikleri nodal foliküler lenfomalara benzer görünür. Buna rağmen hastalar genellikle lokalize ekstranodal hastalığa sahiptir ve sistemik nüks az rastlanır. Testiküler foliküler lenfomalar<sup>124, 125</sup> erişkinlerden farklı olarak çocuklarda artmış sıklıkta raporlanmıştır<sup>126</sup>.

Alman grubunun bir çalışmasında düşük dereceli foliküler lenfomalarda, FL'ların %67'sinde kemik iliğinde tipik paratrabeküler paternde infiltrasyon vardır. Dalak infiltrasyonu %36, Waldeyer halkasının infiltrasyonu %3'tür. Ek olarak, lenfatik olmayan organlar da, mesela GİS %7, karaciğer %7 ya da akciğer %5 oranında etkilenir<sup>127</sup>. Ancak FL'nın lokalize varyantları, spesifik ekstranodal bölgedeki primer

klirik tablo ile tanımlanırlar, yayılma eğilimleri düşüktür ve bunlar çok iyi prognozludur.

#### 2.8.4 İntrafoliküler Neoplazi/"*In Situ*" Foliküler Lenfoma

Vakalar sıklıkla arkitektürel olarak normal görünümlü lenf nodlarıdır ve monomorfik sitolojik görünüm olsun ya da olmasın foliküler lenfomayı destekleyen BCL2 aşırı ekspresyonu gösteren sentrosit ve sentroblastların bulunduğu bir veya daha fazla foliküllere sahiptir<sup>128</sup>. Bu hastaların bir kısmı başka bir yerde foliküler lenfomaya sahiptir,

#### 2.9 Foliküler Lenfoma İmmüfenotipik Alt Grupları

Günümüzde foliküler lenfomalar immüfenotipik olarak 4 alt grup altında değerlendirilmektedir. Bunlar:

- I. CD10-pozitif/BCL2-pozitif
- II. CD10-pozitif/ BCL2-negatif
- III. CD10-negatif/ BCL2-pozitif
- IV. CD10-negatif/ BCL2-negatif

Yapılan çalışmalarda dört alt gruptaki tüm vakalar BCL6 pozitifdir. STMN1 (stathmin), BCL2-negatif veya CD10-negatif FL'ların tanısında ve bunların marjinal zon B hücreli lenfomadan ayırımında yardımcı bir germinal merkez belirteci olarak gündeme gelmektedir.

Klasik CD10-pozitif/BCL2-pozitif FL grubunda *BCL2* rearanjmanı vakaların %68'inde var ve bunların da %73'ü derece 1-2 FL'lardır. CD10-pozitif/BCL2-negatif grupta *BCL2* rearanjmanı vakaların %4'ünde mevcuttur. CD10-negatif/BCL2-pozitif grupta *BCL2* rearanjmanı %38 vakada bulunmuştur. CD10-negatif/BCL2-negatif grupta ise hiçbir vakada *BCL2* rearanjmanı saptanmamıştır. Vakaların %10-15'inde *BCL6* rearanjmanı sonucu translokasyon 3q27 mevcuttur. STMN1, ayrıca onkoprotein 18 olarak da bilinmekte olup, mikrotübül dinamiğini regüle eden anahtar bir proteindir<sup>129</sup>. Önceki çalışmalarda solid ve hematolojik malignitelerde STMN1 aşırı ekspresyonunun tümör davranışı ve prognozu ile ilişkisi gösterilmiştir<sup>130</sup>.

## 2.10 Prognoz ve Prediktif Faktörler

Prognoz tanı anında hastalığın yaygınlığı ile yakından ilişkilidir. IPI ve özellikle FLIPI sonuçları prognozun önemli öngörücüsüdürler<sup>27, 131, 132</sup>.

Histolojik derece foliküler lenfomanın prognozu ile koreledir, derece 1-2 vakalar yavaş seyirli olurlar ve genellikle, nadir<sup>47</sup> lokalize vakalar hariç tedavisi mümkün değildir<sup>21, 24, 133</sup>. Yayımlanan çalışmaların çoğunda, belirgin çok agresif klinik gidişli foliküler lenfomaların büyük hücre ya da derece 3 gibi sınıflandırıldığı gösterilmiştir<sup>25, 26, 134</sup>.

Raporlanan çoğu çalışmada, %25'den fazla difüz alan içeren derece 3 FL vakaları sadece foliküler vakalara göre daha kötü prognozludur<sup>19, 26</sup>.

Del6q23-26, del17p ve *TP53* mutasyonu yanısıra -1p, +12, +18p, +Xp bulunuşu daha kötü gidişlidir ve transformasyon süresini kısaltır<sup>51</sup>. Hem t(14;18) hem de t(8;14) olan nadir vakalar kötü prognoza sahiptir<sup>135</sup>. En son gen ekspresyon verileri, T hücreleri, FDH gibi aksesuar hücreler ve makrofajların, yani mikroçevrenin de FL klinik davranışını belirlemede rol oynadıklarını desteklemektedir<sup>136</sup>.

FL hastalarının %25-35'inde yüksek dereceli lenfomaya, genellikle DBBHL'ya progresyon ya da transformasyon gerçekleşmektedir, ama nadiren Burkitt lenfoma benzeri ya da DBBHL ve Burkitt lenfoma arasında bulunan lenfomalara da transformasyon şeklinde olabilir<sup>137</sup>. Bu olay genellikle tedavi edilmesi zor hızlı progresyon gösteren klinik seyir ve tümörden ölüm ile ilişkilidir<sup>138</sup>. Nadir hastada akut B hücreli lenfoblastik lösemi gelişir<sup>139</sup>. Transformasyon tipik olarak ek genetik anamolileri kapsamaktadır, özellikle *MYC* translokasyonu; *BCL2* ve *MYC* rearanjmanında birliktelik agresif seyir ile ilişkilidir<sup>140</sup>.

## 2.11 EZH2

Yeni-nesil sekanslama teknolojilerinin girişi, hematolojik malignitelerde yeni mutasyonel hedeflerin keşfine yol açtı. Morin ve ark.<sup>63</sup> yakın zamanda, yaklaşık %7 FL vakasında histon metiltransferaz EZH2'nin (Enhancer of Zeste Homolog 2) katalitik SET domaininde somatik heterozigot mutasyonlar rapor ettiler. EZH2 geni "polycomb repressive complex 2" (PRC2)'nin katalitik birimini oluşturan bir histon metiltransferazı kodlamaktadır ve lizin 27'de histone H3'ün (H3K27) metilasyonu ile



gen ekspresyonunun regresyonunda rol oynar. En sık kodon 641'de (Y641) görülen bu mutasyonlar, "gain-of-function" mutasyonları olup histone H3K27 trimetilasyonunda artışla karakterizedir ve GM B-tip diffüz büyük B hücreli lenfomalar ile foliküler lenfomaların patogenezinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir<sup>63</sup>.

B hücrelerinde germinal merkez reaksiyonu sırasında da EZH2'nin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir<sup>141</sup>. EZH2 normal sentroblastlarda anti-proliferatif genlerin sessizleştirilmesinde rol oynamaktadır<sup>142</sup>. Bu bağlamda foliküler lenfomanın germinal merkez B hücrelerinin normal gen ekspresyon programını kullandığını ve aktive edici EZH2 mutasyonları ile B hücrelerinin proliferasyonunun desteklendiği söylenebilir.

Takip eden çalışmalar EZH2 mutasyonlarının FL'larda daha da sık rastlanan bir durum olduğunu ve patogeneizde erken bir basamağı temsil ettiklerini göstermektedir<sup>143</sup>.

EZH2'nin kodon 641'i etkileyen nokta mutasyonları yakın zamanda GMB-DBBHL altkümesinde de tanımlanmıştır<sup>144</sup>, ama aktive B hücre fenotipinden gelen DBBHL (ABH-DBBHL), küçük lenfositik lenfoma, mantle hücreli lenfoma ve germinal merkez fenotipinden yoksun tüm periferik T hücreli lenfomalarda yoktur. EZH2'nin aşırı ekspresyon ve hiperaktivitesi, melanom<sup>145</sup> yanısıra, prostat<sup>146, 147</sup>, meme ve endometrial kansinoları içeren bir takım kanser tiplerinin patogenezinin de kapsamaktadır. Bu artmış EZH2 ekspresyonu potansiyeli olan yeni bir farmakolojik hedefi gündeme getirmektedir ve çeşitli kanserlerde bu konudaki çalışmalar sürmektedir<sup>148, 149</sup>.

## 2.12 EPHA7

Ephrin reseptörler, dimerlerden oluşan tirozin kinazlardır ve ephrin eksprese eden hücrelerle temas olduğunda aktive olurlar<sup>150, 151</sup>. Hücre-hücre sinyal iletimi, embriyonik gelişim, nörogenez ve anjiogenezde rol oynarlar<sup>152, 153</sup>. Epitelyal tümörlerde ephrin reseptörleri için hem onkojenik hem tümör süpresör roller tanımlanmıştır<sup>153-156</sup>. Bu grubun üyesi olan EPHA7, "truncated" bir EPHA7TR protein kodlayan "short splice" varyantının oluşu ile öne çıkmıştır. Bu EPHA7TR hücre

yüzeyinden salınabilir ve “full length” reseptörün inhibitörü olarak görev yapar, böylece diğer EPHA reseptörlerinden kaynaklanan onkogenik sinyalleri bloke eder. EPHA7 lenfoid dokularda yüksek miktarda eksprese olmaktadır. Normal B hücrelerinin, EPHA7'nin bu “short splice” varyantını eksprese ettikleri gösterilmiştir<sup>154, 157, 158</sup>, ancak B hücre matürasyon ve aktivasyonundaki rolü henüz netleşmemiştir. Bugünkü bilgiler ışığına EPHA7 normal B hücrelerinden salınarak oto-parakrin olarak etkir, EPHA2'ye bağlanarak bu reseptörün ERK ve SRC kinazlar üzerinden sinyal iletimini bloke eder. Bu şekilde bir çeşit tümör süpresör olarak fonksiyon gösterdiği gösterilmiştir<sup>59</sup>.

Lenfomalarda EPHA7'nin delesyon ve epigenetik sessizleştirmeye uğradığı gösterilmiştir. FL'ların %70'inde EPHA7'nin ekspresyonu tamamen kaybolmuştur, promoter metilasyonuna bağlı olarak EPHA7'nin sessizleştirilmesi veya delesyonu söz konusudur. FL'larda sık görülen 6q delesyonları bu genin eksikliği ile ilişkilidir. Hücre yüzeyinden salınarak görev yapabildiğinden bu proteinin dışardan verilebilmesi EPHA7 eksikliğinin bu şekilde giderilebilmesi olasılığını doğurmaktadır. Hücre kültür çalışmalarında lenfoma hücrelerine EPHA7 verilmesi ile ERK ve SRC aktivitesi inhibe edilmiş ve hücre ölümünün gerçekleştiği görülmüştür. Bu nedenle EPHA7 potansiyel terapötik bir ajan olarak lenfoma tedavisinde umut vaad edicidir<sup>154, 157, 158</sup>.

### 2.13 Tedavi

FL en sık görülen ağrısız nodal lenfoma grubudur. Ayrıca anti-CD20 antikoru olan ritüksimab içeren terapilere rağmen iyileşmesi zor olan bir lenfomadır<sup>159</sup>. Son zamanlarda genomik çalışmalar ve yeni deneysel modeller patogenezine yeni bir anlayış getirmiştir. Foliküler Lenfoma Uluslararası Prognostik İndeks (FLIPI), klinik faktörlerin skorlama sistemidir ve hastaların gidişatını tahmin etmek için kullanılır<sup>131</sup>. Asemptomatik dissemine hastalara olan yaklaşım tartışmalıdır ve hastanın tedavisiz takibinden, ritüksimab veya ritüksimaba ek kemoterapiye kadar değişkenlik göstermektedir<sup>159</sup>. Bu yaklaşımlar yüksek cevap oranlarına ulaşmakta ve genel sağkalım zamanı 10 yılın üzerinde bulunmaktadır<sup>160</sup>. Ancak nüks kaçınılmazdır ve kemoterapinin komplikasyonları hastaya olan uzun vadeli yaklaşımı etkilemektedir<sup>100</sup>. Otolog transplantasyonun faydalı olup olmadığı henüz belirlenmemiştir. Allojenik transplantasyon gençlerde ve bu hastalık dışında sağlıklı

olanlarda tedavi şansı sağlamaktadır, ancak riskli bir yöntemdir<sup>159</sup>. FL'nin DBBHL benzeri hastalığa transformasyonu en önemli komplikasyondur. Transformasyon agresif kemoterapi kombinasyonlarının hızlı olarak başlanmasını gerektirmektedir<sup>98</sup>. Transformasyon, gidişatı şiddetli bir şekilde kötüleştirmekte ve FL hastaları için 10 yıllık yaşamı %75'den %36'ya düşürmektedir<sup>100</sup>.

FL'nin son zamanlarda tanımlanan genetik lezyonları, potansiyel yeni ilaç tedavi seçenekleri oluşturmaktadır. Tablo 2'de bu yeni tedavi seçeneklerinin bir kısmı görülebilir (Tablo 2.4). BCL2 hedefe yönelik bu tedavi seçeneklerinin hedeflerinden biridir. BCL2 homolog 3 alanı (BH3) içeren ilaçlar BCL2 ve bu alanı içeren diğer pro-apoptotik BCL2 ailesi proteinlerini inhibe edebilmektedir<sup>161, 162</sup>.

EZH2 potansiyel bir diğer hedefi oluşturmaktadır<sup>64, 65, 163</sup>. Bazı ilaç şirketleri buna karşı inhibitörler geliştirmektedir<sup>164</sup>. Bu yeni ilaçların sadece EZH2 mutant küçük bir grupta mı etkili olacağı yoksa EZH2 bağımlılığı gösteren ancak mutasyon saptanmayan çok daha geniş bir FL grubuna mı etkili olacağı merak konusudur. Günümüzde bu ilaçların insanlarla ilişkili dozları ve formülasyonları hakkında bilgi yoktur.

BCR sinyali foliküler lenfomalarda açıkça aktivedir ve BCR sinyali yaşamları için gereklidir<sup>165</sup>. Bu yolak üzerinde yer alan BTK, PI3K delta inhibisyonu ile BCR sinyalini hedefleyen ilaçlar günümüzde mevcuttur<sup>166, 167</sup>.

FL vakalarının birçoğunda kaybolduğu bilinen EPHA7'nin restorasyonu gelecekte görebileceğimiz bir diğer tedavi seçeneğidir. CD20 ile kombine edilerek bu proteinin FL hücrelerine ulaştırılması üzerine çalışmalar yapılmaktadır<sup>168</sup>.

**Tablo 2.4:** Foliküler Lenfomanın güncel ve acil tedavi seçeneklerinin özeti<sup>168</sup>.

Güncel Tedavi	Kemoterapi ve Antikor Kombinasyonları (CHOP + Rituksimab)		
Yeni Terapiler	Sinyal iletimi	İbrutinib (BTK inhibitörü, BCR sinyal yolağı), Cal-101 (PI3K inhibitörü, BCR sinyal yolağı)	
		EPHA7-hCD20 (EPHA7'nin CD20 antikor aracılığıyla FL hücrelerine ulaştırılması ve EPHA7 aktivitesinin restorasyonu)	
	Apoptoz	ABT-737, ABT-199 Obatoklaks (EPHA7'nin CD20 antikor aracılığıyla FL hücrelerine ulaştırılması ve EPHA7 aktivitesinin restorasyonu)	
	Hücre döngüsü	PD-0332991	
	Epigenetik	EZH2 inhibitörleri (vs.* GSK126, EI-1, EPZ005687)	
	İmmünoterapi		Anti-CTLA4
			Anti-PD-1L
		CAR-anti-CD19	

\*vs.:vesaire (örneğin)

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan çalışma için etik izni alındıktan sonra (karar no: GO 13/536-14), Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 1223 numaralı bilimsel araştırma projesi olarak destenledi.

#### 3.1 Olgu Seçimi

Bu çalışma için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2000 – 2014 tarihleri arasında solid organ biyopsisi gerçekleştirilmiş FL hastaları Patoloji Anabilim Dalı rapor arşivinden retrospektif olarak taranmış ve olgular hastane veri tabanından elde edilmiştir. Veri tabanından, hastaların FL tanısı aldıkları ve çalışmada kullandığımız biyopsi örneklerinin alındığı tarihler ve vefat ettiyse ölüm tarihleri kaydedilmiştir. Komplike olduğu düşünülen, tanı zorluğu yaratan ve hasta spesmenine zarar verme olasılığının gündeme gelebileceği çok küçük dokular ve ince iğne biyopsileri çalışmadan çıkarılmıştır. Bu şekilde toplam 441 olguya ulaşılmıştır.

#### 3.2 Histomorfoloji

441 olgu içinden foliküler lenfoma tanısı şüpheli, immünohistokimyasal paneli eksik olan vakalar çıkarılmış ve kalan 239 tane vaka mikroskopik olarak değerlendirilmiştir. Bu kalan hastaların spesmenlerine ait hematoksilen-eozin kesitler 2 patolog (AY, EAS) ile birlikte incelenmiştir. Tüm vakaların, morfoloji ve fenotipi esas olacak şekilde, FL derecelendirmesi için 2008 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Hematopoetik ve Lenfoid Doku Tümörlerinin Sınıflamasının kriterlere uygun olarak FL tanıları teyit edilmiş, derece 3A ve 3B morfolojisi baskın olan FL'lar çalışmadan çıkarılmıştır. Bu kriterlere uyacak şekilde seçtiğimiz vaka sayısı 125'tir. Ancak başka bir merkezden bölümümüze konsültasyon amacı ile gelmiş olan vakalardan 23 tanesinin bloklarına ulaşamamıştır. Böylece toplam 98 hastaya ait 102 adet vaka çalışmaya dahil edilmiştir. Seçilen tüm vakalarda foliküler gelişim paterni, histolojik derece, BCL2 proteinin durumu ve BCL2 rearanjman analizi için FISH yapılmış olanlarda FISH çalışmalarının sonuçları kaydedildi. Bu örnekler içerisinde 94 adet lenf nodu, 2 adet dalak, 2 adet tonsil, 2 adet orbital bölge ve 2 adet subkutan doku

biyopsisinin yer aldığı görüldü. 3 hastanın farklı zamanlarda alınmış olmak üzere 7 adet solid organ biyopsisi mevcuttur.

### 3.3 İmmünohistokimya

Seçilen foliküler lenfoma vakalarının formalinde fikse parafine gömülü doku kesitlerinden immünohistokimyasal çalışma için temsili blok seçimi yapıldı. 3 farklı BCL2 antikoru (klon E17, klon 100/D5 ve klon SP66), EPHA7 ve EZH2 antikolarının ekspresyonları immünohistokimyasal boyamalarla değerlendirildi.

Kullanılan antikoların özellikleri tablo 3.1’de verilmiştir. Dilüsyonlar ve optimum boyama tekniği uygun pozitif kontroller kullanılarak ayarlandı. BCL2 ve EZH2 için kontrol olarak reaktif germinal merkez içeren tonsil ve lenf nodu kesitleri kullanıldı. EPHA7 için kontrol dokusu olarak böbrek korteksi ve lenf nodu kesitleri birlikte kullanıldı, uygun dilüsyonda vasküler yapılarda pozitif boyanma elde edildi. Formalinde fikse parafine gömülü dokulardan elde edilen 5 mikron kalınlığındaki kesitler, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi immünohistokimya laboratuvarında yarım saat 70 derecelik etüvde bekletildikten sonra otomatik immünohistokimyasal boyama cihazları (Ventana Benchmark XT ve Leica Bond Max) ile boyanarak immünohistokimyasal boyamalar gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3.1:** Kullanılan antikoların özellikleri.

Antikor	Firma	Klon	Dilüsyon	Antijen açığa çıkarma
BCL2	Spring Bioscience	SP66	1:200	ER2 (EDTA)*
BCL2	Leica	100/D5	1:40	ER2 (EDTA)*
BCL2	Abcam	E17	1:100	ER2 (EDTA)*
EPHA7	Santa Cruz Biotech	Monoklonal (A-18)	1:75	Önişlemsiz
EZH2	Leica	Monoklonal	1:400	ER2 (EDTA)*

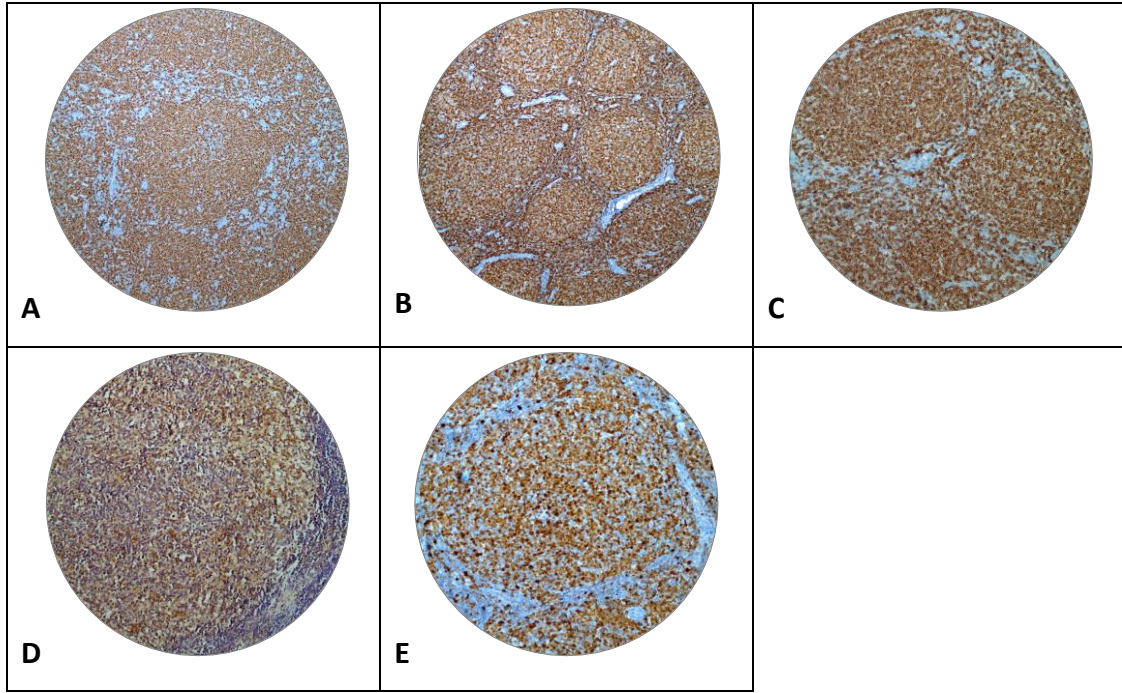
Kısaltmalar: BCL2, B Cell Lymphoma 2; EPHA7, Ephrin Receptor A7; EZH2, Enhancer of Zeste Homolog 2 (Drosophila); ER, Epitop Retrieval-2 numaralı solüsyon.

\*Basınçlı kapta pH=8 EDTA solüsyonunda 3 dakika.

### 3.3.1 İmmünohistokimyanın Değerlendirilmesi

İmmünohistokimyasal boyamaların sonuçları değerlendirilirken 40x objektif kullanıldı. Değerlendirmede her bir belirteç için uygun boyanma paterni (nükleer, sitoplazmik) göz önüne alındı. BCL2 antikoru ile boyanan preparatlar sitoplazmik pozitiflik açısından değerlendirilip, foliküllerdeki pozitif, negatif ya da parsiyel pozitiflik kaydedilmiştir. EPHA7 antikoru ile foliküllerdeki neoplastik hücrelerde sitoplazmik pozitiflik veya negatiflik kaydedilmiştir.

EZH2 antikoru ile foliküllerdeki sentrositlerde ve sentroblastlarda farklı nükleer boyanma paterni izlenmiştir. Her vakaya ait foliküller için boyanma yoğunluğu (intensite) kaydedilmiştir. Boyanma yoğunluğu 1, 2, 3 olarak skorlanmıştır. Yoğunluk açısından değerlendirmenin objektifliği açısından kuvvetli (kontrol kadar) boyanma 3, hiç boyanmama veya zorla seçilebilen boyanma değeri 1 olarak değerlendirilmiştir. Bu iki grup arasındaki her türlü boyanma yoğunluğunun skoru 2 olarak kabul edilmiştir. İmmünohistokimyasal belirteçlerin boyanma paternleri Şekil'de belirtilmiştir.



**Şekil 3.1:** İmmünohistokimyasal belirteçlerin boyanma paternleri. A) Sitoplazmik BCL2 rutin klon 100/D5 ekspresyonu (İHK, anti BCL2 Ab, 100x). B) Sitoplazmik BCL2 klon E17 ekspresyonu (İHK, anti BCL2 Ab, 100x). C) Sitoplazmik BCL2 klon SP66 ekspresyonu (İHK, anti BCL2 Ab, 200x). D) Sitoplazmik EPHA7 ekspresyonu (İHK, anti EPHA7 Ab, 200x). E) Nükleer EZH2 ekspresyonu (İHK, anti EZH2 Ab, 200x).

İmmünohistokimyasal çalışmaların sonucunda belirteçlerin farklı tümör tanı kategorilerindeki ekspresyon durumu istatistiksel yöntemlerle karşılaştırıldı.

### 3.4 Doku Mikro Dizinlerinin (“Tissue Microarray”=TMA) Hazırlanması

Her vaka için 1 mm çaplı 2 adet doku örneği Advanced Tissue Arrayer (Ata 100) cihazı ile elde edildi. 44 hastanın primer tümörünü kapsayan toplam 44 materyalden doku mikro dizin bloğu hazırlandı.

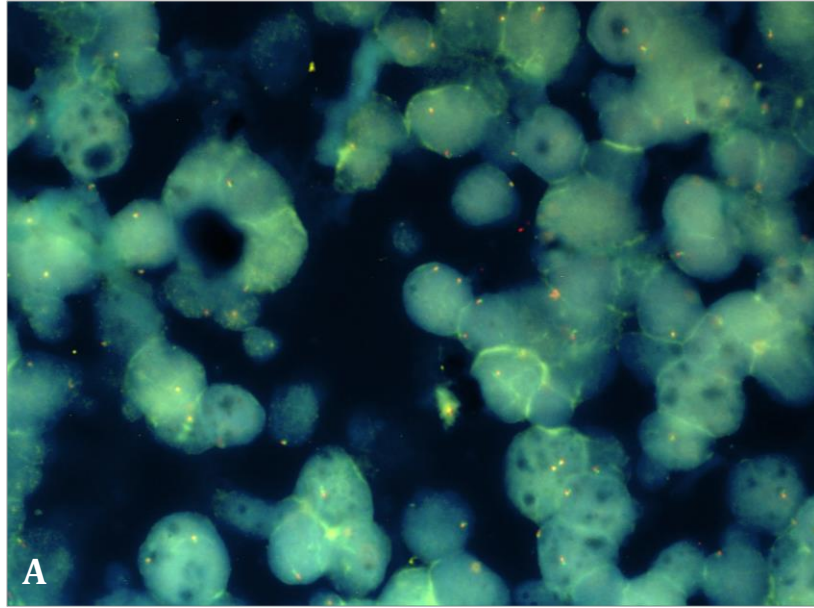
44 hastaya ait formalin fikse parafine gömülü çoğunluğu lenf nodu olan dokularına ait preparatlar yeniden değerlendirilerek her vaka için en tanışal tek blok seçildi. Seçilen blokların hematoksilen eozin kesitleri tekrar incelenerek tümörü temsil eden hücresel olarak en bol iki ayrı alan işaretlendi. Bu işaretlere kesitlerin parafin bloklarında karşılık gelen alanlardan 1 mm çaplı dokular elde edilerek manuel doku mikrodizin aracı Advanced Tissue Arrayer (ATA100, CTR scientific) ile 1 adet doku mikro dizin bloğu oluşturuldu. Doku mikro dizin bloğuna 44 vaka 88 adet doku yerleştirildi. Ayrıca bu mikro dizine kontrol maksatlı 6 adet insan palatin tonsil

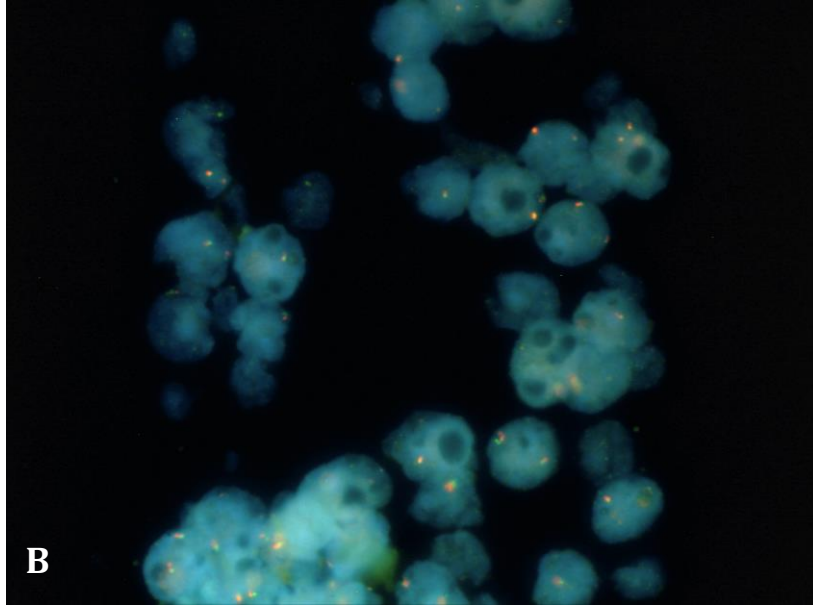


dokuları ve referans amaçlı 5 adet insan düz kas neoplazm doku örnekleri sistematik bir düzende ilave edildi. Oluşturulan bloktan (+) yüklü lamlara in-situ hibridizasyon için 4 mikrometre kalınlıkta kesitler alındı.

### 3.5 İn-Situ Hibridizasyon (İSH)

BCL2 antikorunun herhangi bir klonu ile negatif ya da parsiyel pozitif saptanan tüm vakalar için TMA bloğu hazırlandı. Bu bloğa BCL2 pozitif klasik FL grubundan 4 adet vaka kontrol amaçlı eklendi. Doku mikro dizin bloklarından (+) yüklü lamlara alınan 4 mikron kalınlığındaki kesitlere *BCL2* gen lokus (Repeat-Free Poseidon FISH DNA Probes on BCL2 (18q21) Break (tissue); Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Netherlands) spesifik break-apart probu kullanılarak, *BCL2* in-situ hibridizasyon uygulandı. Bu proplar kullanılarak *BCL2* geninin durumuna bakıldı (Şekil 3.2).





**Şekil 3.2:** İn-Situ Hibridizasyon çalışmasının görünümü. A ve B) *BCL2* gen kopyaları bir kırmızı bir yeşil nokta halinde izlenmektedir (FISH, 1000x).

Değerlendirme ışık mikroskopunda 100x objektif kullanılarak yapıldı. Her bir vakada 100 adet hücrede yeşil ve kırmızı renkli sinyallerin birbirinden ayrılma durumlarına bakıldı ve yorumlandı.

### 3.6 İstatistiksel Analiz

Kategorik değişkenler için sayı ve yüzde değerleri ile tek sayısal değişkenler için ortanca, ortalama, standart sapma, minimum-maksimum değerleri kullanılmıştır. Nominal değişkenlerin araştırma grubu içindeki sıklıkları yüzdeler halinde verilmiştir. Nitel değişkenler arasındaki ilişkinin incelenmesinde Pearson ki-kare testi kullanılmıştır. Cohen'in kappa katsayısı ile iki değerleyici arasındaki karşılaştırmalı uyuşmanın güvenilirliği ölçülmüştür. Sağ kalım sürelerinin hesaplanmasında Kaplan-Meier eğrileri çizilmiş, Log-Rank testi ile sağkalımlar ve çeşitli diğer değişkenler arasındaki ilişkiler aranmıştır. Tek değişkenli analizler için anlamlılık düzeyi 0,05 olarak belirlenmiştir. Kappa değeri için anlamlılık durumu sırasıyla 0: uyum yok, 0-0,2: uyum anlamlı, 0,2-0,4: vasat uyum, 0,4-0,6: iyi uyum, 0,6-0,8: önemli derecede uyum, 0,8-1: mükemmel yakın uyum olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel analiz IBM SPSS 20 paket programında yapılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Klinik Bulgular (Tablo 4.1)

Çalışmaya dahil edilen toplam 102 hastanın 50'si (%49,0) erkek, 52'si (%51,0) kadındır. Tanı anındaki hasta yaş ortalaması 57,5 (ortanca 56,50; aralık 29 – 96)'dir. Sağkalım durumu bilinen 87 olgunun ortalama genel sağkalım süresi 160,835 aydır. Olguların genel sağkalım olasılığı 0,791 olarak bulunmuştur (Şekil 4.1). En kısa takip süresi 5 ay, en uzun takip süresi 186 aydır. Takip süreleri sonunda 102 hastanın 15 (%14,7)'ine ait sağkalım bilgisine ulaşılamamıştır. Sağkalım bilgisine ulaşılabilen olguların 87 (%85,2)'si 1 Eylül 2014 itibariyle sağ olup, 12 (%11,7)'sinin tanı verilme tarihi ile 1 Eylül 2014 arasında bir tarihte vefat ettiği saptanmıştır (Tablo 4.2).

Hastaların kliniğe en sık başvuru nedeni lenfadenopatidir.

**Tablo 4.1:** Klinik özellikler.

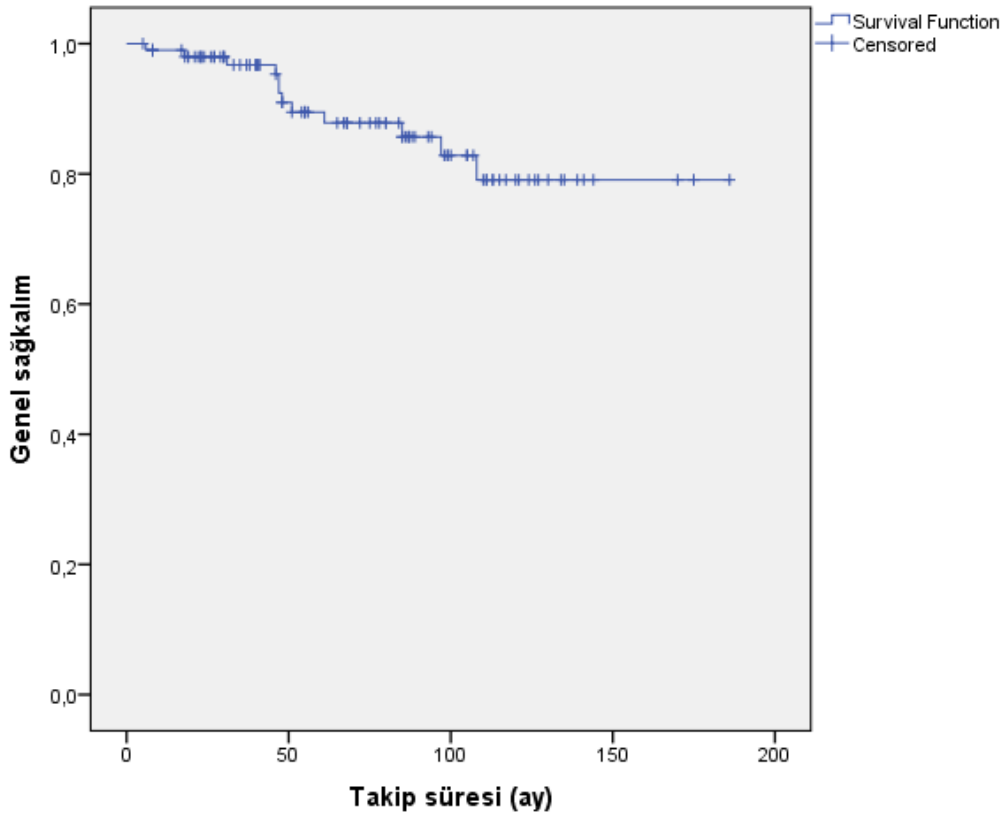
Cinsiyet	N (%)
Kadın	52 (%51,0)
Erkek	50 (%49,0)
Tanı Yaşı	Yıl
Min-maks	29-96
Ortalama	57,5
Takip Süresi	Ay
Min-maks	5-186
Ortalama	160,835
Kemik İliği Tutulumu	N (%)
Var	27 (%26,5)
Yok	41 (%40,2)
Bilinmiyor	34 (%33,3)
Derece	N (%)
1	29 (%28,4)
2	40 (%39,2)
1-2	33 (%32,4)
Patern	N (%)
<%25	1 (%1,0)
%50-75	6 (%5,9)

>%75	95 (%93,1)
<b>Lokalizasyon</b>	<b>N (%)</b>
Lenf Nodu	94 (%92,2)
Tonsil	2 (%2,0)
Dalak	2 (%2,0)
Orbital Bölge	2 (%2,0)
Subkutan Doku	2 (%2,0)

Sağkalım durumu bilinen olguların, sağ olanların tanı anındaki yaş ortalaması 56,72 (ortanca 56; aralık 29 - 87), ölmüş olanların tanı anındaki yaş ortalaması 63,33 (ortanca 63; aralık 39 - 96) olarak bulunmuştur.

**Tablo 4.2:** Olguların sağkalım-ölüm durumları.

	<b>Olgu Sayısı (N)</b>	<b>Tüm Olgular (%)</b>	<b>Sağkalımı Bilinen Olgular (%)</b>
<b>Sağ</b>	75	73,5	86,2
<b>Ölüm</b>	12	11,7	13,7
<b>Sağkalımı bilinen olgular</b>	87	85,2	100,0
<b>Sağkalımı bilinmeyen olgular</b>	15	14,7	
<b>Toplam</b>	102	100,0	



**Şekil 4.1:** Hastaların genel sağkalım eğrisi (Kaplan-Meier eğrisi; x: ay, y: sağkalım olasılığı, censored: takipten çıkma sebebi ölüm olmayan olgular).

Yapılan korelasyon analizlerinde hastaların cinsiyeti ile genel sağkalım süresi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır.

#### 4.2 Morfolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular

İncelenen 102 biyopsi örneğinin 94 tanesi lenf nodu, geri kalan 2 örnek orbita, 2 örnek palatin tonsil, 2 örnek dalak ve 2 örnek deri biyopsisidir.

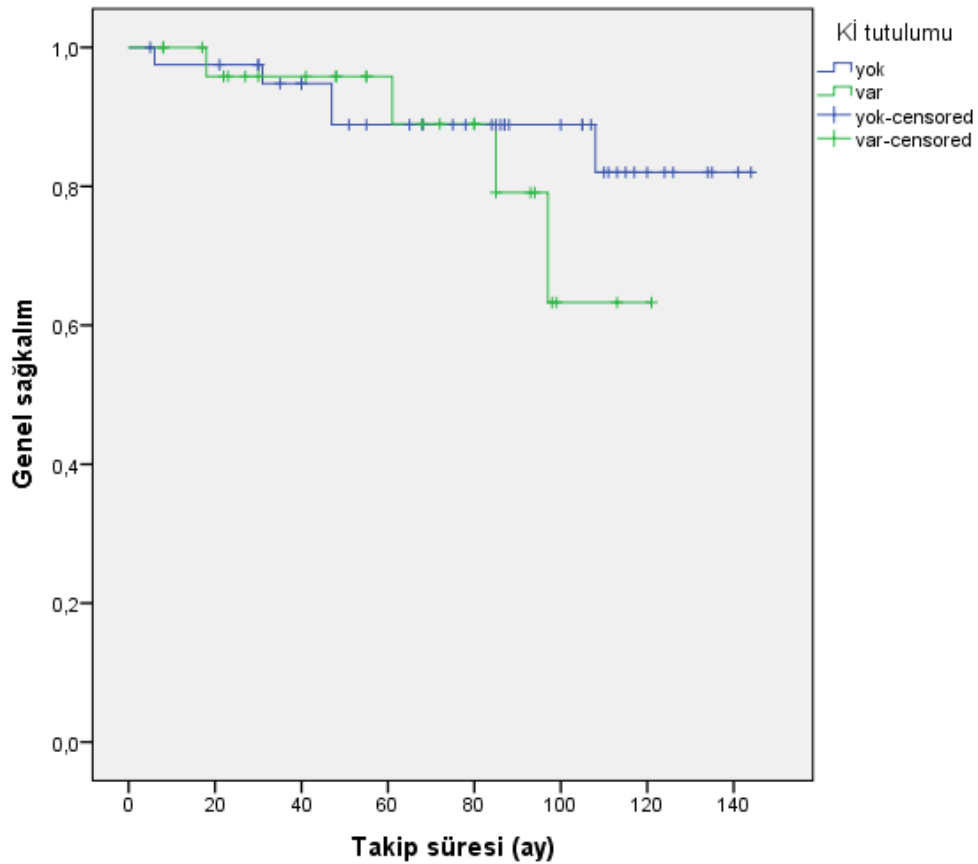
Tanısal biyopsilerin çoğu lenf nodu vakalarıdır; bunlar servikal, aksiller, inguinal ya da femoral lenf nodudur.

Formalin fikse parafine gömülü bloklardan hazırlanan dokulardan bir kısmının immünohistokimyasal boyamalar esnasında dökülmesi, bir kısım örnekteki tümörlü dokunun bitmesi nedeni ile değerlendirilebilen vaka sayıları ile çalışılan immünohistokimyasal belirteçler arasında farklılıklar vardır.

#### 4.2.1 Kemik İliği Tutulumu

Vakaların 34 (%33,3)'ünde veri tabanından bilgi edinilemedi, toplam 68 (%66,7) adet vakanın bilgisine ulaşılabildi. Bilgisine ulaşılan bu 68 vaka içerisinde kemik iliği tutulumu olan 27 (%39,7, toplam vakaların %26,5'i), kemik iliği tutulumu olmayan 41 (%60,2, toplam vakaların %40,2'si) vaka bulunmuştur.

Kemik iliği tutulum durumu billinen 68 vakanın genel sağkalım ortalaması 126,960 ay, bunlardan tutulumu olanların genel sağkalım ortalaması 105,245 ve tutulumu olmayanların ise 129,282'dir. Long-Rank (Mantel-Cox) testi ile hastaların kemik iliği tutulumu ve genel sağkalım durumu karşılaştırıldığında, tutulumu var olan vakaların genel sağkalımları tutulumu olmayan vakalara göre daha düşük olarak bulunmuştur ( $p=0,726$ ). Kemik iliği tutulum durumlarının Kaplan-Meier eğrileri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2:** Hastaların kemik iliği tutulumu ile genel sağkalım eğrisi (Kaplan-Meier eğrisi; x: ay, y: sağkalım olasılığı, censored: takipten çıkma sebebi ölüm olmayan olgular).

Her üç BCL2 antikoru birarada değerlendirildiğinde pozitif, negatif ve parsiyel pozitif olarak saptanan vakaların kemik iliği tutulumu ile ilişkisine bakıldı ( $p=0,081$ ) (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3:** BCL2 antikoru ile kemik iliği tutulumu ilişkisi.

		BCL2 Son Durum (N/%)			
		Negatif	Pozitif	Parsiyel	Toplam
Kemik iliği Tutulumu	Yok	2 (4,9)	36 (%87,8)	3 (%7,3)	41 (%100,0)
	Var	0 (%0,0)	24 (%88,9)	3 (%11,1)	27 (%100,0)
	MD	5 (%18,7)	22 (%68,8)	4 (%12,5)	31 (%100,0)
Toplam		7 (%7,1)	82 (%82,8)	10 (%10,1)	100 (%100,0)

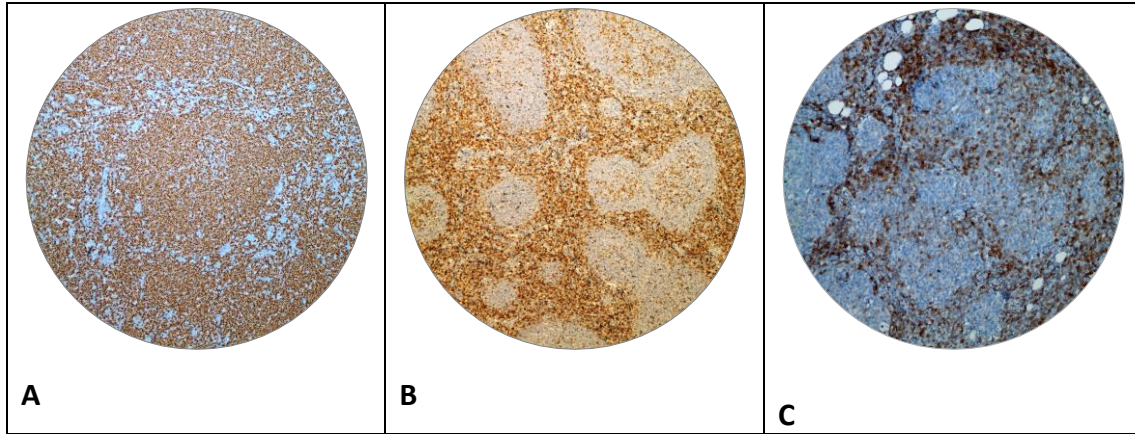
Kısaltmalar: MD, mevcut değil.

#### 4.2.2 BCL2

Toplam 102 adet vaka içerisinde BCL2 klon E17 ile 99 adet, klon 100/D5 ve klon SP66 ile 100 adet vakanın örnekleri değerlendirilebildi. Her bir vaka bu üç farklı klonla ayrı ayrı değerlendirildi ve sonra bunların her üçü de göz önüne alınarak bir son durum BCL2 sonucu belirlendi. Ayrıca vakaların bir kısmında BCL2 antikoru bazı folliküllerde pozitif olup, bazı folliküllerde negatif olarak saptanmıştır. Bu durumun fiksasyona bağlı olmadığı düşünülen vakalar için parsiyel adında ayrı bir grup oluşturulmuştur.

##### 4.2.2.1 BCL2 klon 100/D5

Sitoplazmik BCL2 ekspresyonu 100 adet tümörlü vakada değerlendirilebildi (Tablo 4.4). Klon 100/D5 antikoru ile pozitif saptanan hiçbir vakanın BCL2 son durumu negatif değildir, bunlar parsiyel gruba dahil edilmiştir. Rutin klon ile negatif 22 vakanın 7 (%31,8)'sinde BCL2 son durum negatif olarak bulunmuştur. BCL2 klon 100/D5 ile BCL2 son durum arasındaki kappa uyum istatistik sonucu  $K=0,563$  (orta derece uyum) ve  $p<0,001$  olarak bulunmuştur (Şekil 4.3) (Tablo 4.4).



**Şekil 4.3:** Foliküllerde BCL2 klon 100/D5 ekspresyonu. A) BCL2 pozitif FL. B) BCL2 negatif FL (A ve B; İHK, anti BCL2 ab; 100x). C) BCL2 parsiyel pozitif FL (İHK, anti BCL2 ab, 200x).

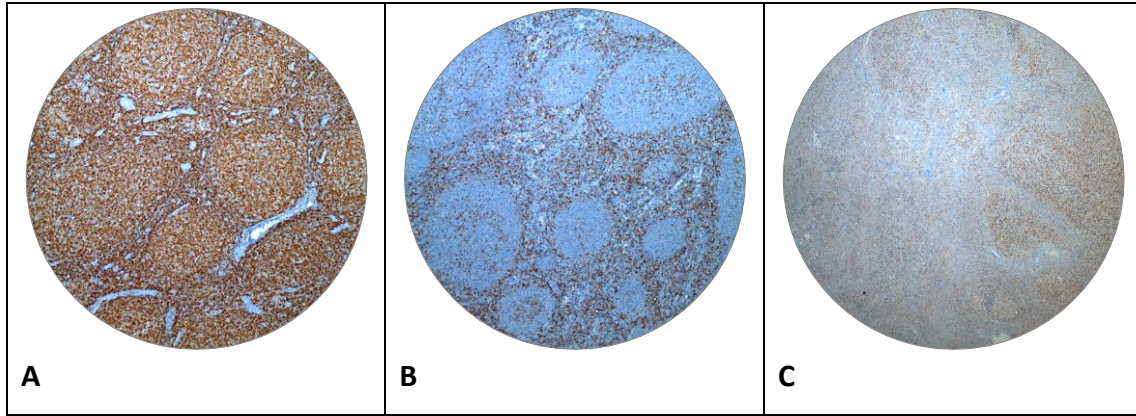
**Tablo 4.4:** BCL2 klon 100/D5 ile BCL2 son durumun uyumluluk değerlendirilmesi.

		BCL2 son durum (N/%)			Toplam
		Negatif	Pozitif	Parsiyel	
BCL2 klon 100/D5	Negatif	7 (%31,8)	10 (%45,5)	5 (%22,7)	22 (%100,0)
	Pozitif	0 (%0,0)	73 (%98,6)	1 (%1,4)	74 (%100,0)
	Parsiyel	0 (%0,0)	0 (%0,0)	4 (%100,0)	4 (%100,0)
	Toplam	7 (%7,0)	83 (%831,0)	10 (%10,0)	100 (%100,0)

#### 4.2.2.2 BCL2 klon E17

Sitoplazmik BCL2 ekspresyonu 99 tümörlü vakada değerlendirilebildi (Tablo 4.5). Klon E17 antikoru ile negatif saptanan 15 vakanın 7 (%46,7)'sinde BCL2 son durum negatif olarak bulunmuştur. BCL2 klon E17 ile BCL2 son durum arasında kapa uyum istatistik sonucu  $K= 0,680$  (önemli derecede uyum) ve  $p<0,001$  olarak bulunmuştur (Şekil 4.4) (Tablo 4.5).





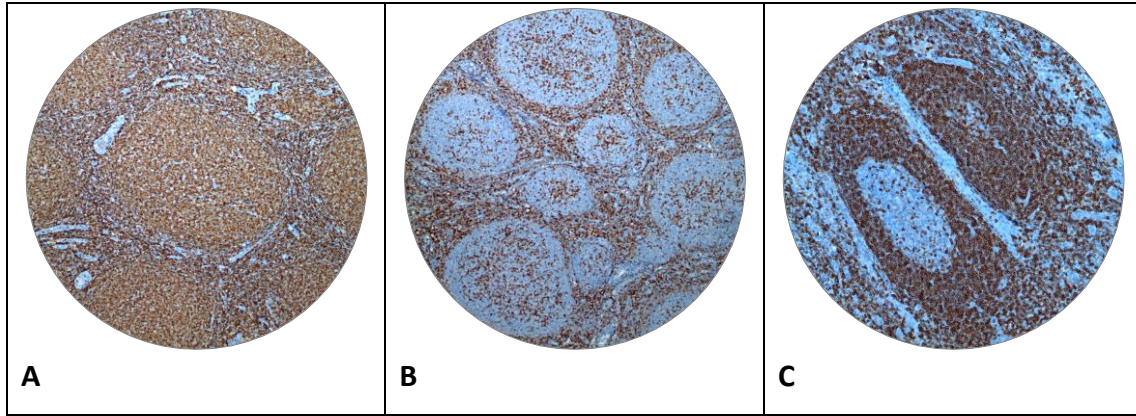
**Şekil 4.4:** Foliküllerde BCL2 klon E17 ekspresyonu. A) BCL2 pozitif FL (İHK, anti BCL2 ab, 100x). B) BCL2 negatif FL (İHK, anti BCL2 ab, 100x). C) Parsiyel pozitif FL (İHK, anti BCL ab, 40x).

**Tablo 4.5:** BCL2 klon E17 ile BCL2 son durumun uyumluluk değerlendirilmesi.

		BCL2 son durum (N/%)			Toplam
		Negatif	Pozitif	Parsiyel	
BCL2 klon E17	Negatif	7 (%46,7)	4 (%26,7)	4 (%26,7)	15 (%100,0)
	Pozitif	0 (%0,0)	78 (%97,5)	2 (%2,5)	80 (%100,0)
	Parsiyel	0 (%0,0)	0 (%0,0)	4 (%100,0)	4 (%100,0)
	Toplam	7 (%7,1)	82 (%82,8)	10 (%10,1)	99 (%100,0)

#### 4.2.2.3 BCL2 klon SP66

Sitoplazmik BCL2 ekspresyonu 100 tümörlü vakada değerlendirilebildi (Tablo 4.6). Klon SP66 antikoru ile pozitif saptanan 85 vakanın hiçbirinde BCL2 son durum negatif değildir; negatif saptanan 9 vakanın 7 (%77,8)'sinde BCL2 son durum negatif olarak bulunmuştur. BCL2 klon SP66 ile BCL2 son durum arasında kappa uyum istatistik sonucu  $K=0,823$  (mükemmele yakın uyum) ve  $p<0,001$  olarak bulunmuştur (Şekil 4.5) (Tablo 4.6).



**Şekil 4.5:** Foliküllerde BCL2 klon SP66 ekspresyonu. A) BCL2 pozitif FL. B) BCL2 negatif FL. C) Parsiyel pozitif FL (A, B ve C; İHK, anti BCL ab; 200x).

**Tablo 4.6:** BCL2 klon SP66 ile BCL2 son durumun uyumluluk değerlendirilmesi.

		BCL2 son durum (N/%)			Toplam
		Negatif	Pozitif	Parsiyel	
BCL2 klon SP66	Negatif	7 (%77,8)	1 (%11,1)	1 (%11,1)	9 (%100,0)
	Pozitif	0 (%0,0)	82 (%96,5)	3 (%3,5)	85 (%100,0)
	Parsiyel	0 (%0,0)	0 (%0,0)	6 (%100,0)	6 (%100,0)
	Toplam	7 (%7,0)	83 (%83,0)	10 (%10,0)	100 (%100,0)

#### 4.2.2.4 BCL2 Son Durum

Toplam 102 vaka içinde standart BCL2 antikoruna (klon 100/D5) ile 22 (%21,6) vaka negatif, 74 (%72,5) vaka pozitif ve 4 (%3,9) vaka parsiyel pozitifdir. BCL2 klon E17 antikoruna ile 15 (%14,7) vaka negatif, 80 (%78,4) vaka pozitif ve 4 (%3,9) vaka parsiyel pozitif saptanmıştır. BCL2 SP66 klonu ile 9 (%8,8) vaka negatif, 85 (%83,3) vaka pozitif ve 6 (%5,9) vaka parsiyel pozitif bulunmuştur. Her üç BCL2 antikoruna ile birlikte değerlendirildiğinde 7 (%6,8) vaka negatif, 83 (%81,3) vaka pozitif ve 10 (%9,8) vaka parsiyel pozitifdir (Tablo 4.7).

**Tablo 4.7:** Her üç BCL2 antikorları ve son durumları.

	Klon 100/D5	Klon E17	Klon SP66	Son Durum
<b>Negatif</b>	22 (%21,6)	15 (%14,7)	9 (%8,8)	7 (%6,8)
<b>Pozitif</b>	74 (%72,5)	80 (%78,4)	85 (%83,3)	83 (%81,3)
<b>Parsiyel</b>	4 (%3,9)	4 (%3,9)	6 (%5,9)	10 (%9,8)
<b>Toplam</b>	100 (%98,0)	99 (%97,1)	100 (%98)	100 (%98,0)

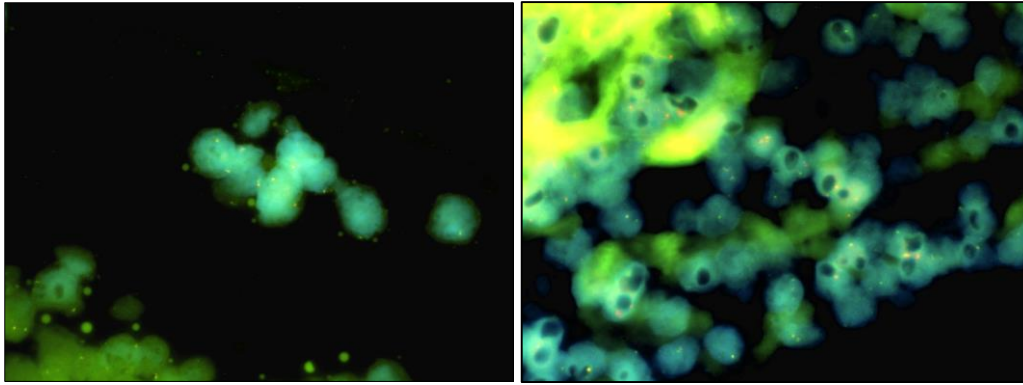
Bu üç BCL2 antikoru ile değerlendirme sonucunda negatiflik oranı en az olarak bulunan antikor klon SP66'dır. Ayrıca bu kolunun fiksasyona en az hassas olduğu gözlemlendi. Klon 100/D5 antikoru ile ise negatifliğin fazla ve bu kolunun fiksasyona çok hassas olduğu gözlemlendi.

### 4.3 Floresan İn-Situ Hibridizasyon Bulguları

Her üç BCL2 antikorundan biri ile negatif ve parsiyel pozitif saptanan 40 adet olgudan hazırlanan TMA bloğuna *BCL2* gen statüsü çalışıldı.

#### 4.3.1 *BCL2* Geni Durumu

*BCL2* break-apart probu kullanılarak yapılan FISH analizlerinde, içinde kontrol grubunun bulunduğu 44 olgunun 28 (%63,6)'inde sinyal elde edilebilmiş, geri kalan 16 (%36,3) vakada dokudan kaynaklı nedenlerden dolayı sonuç elde edilememiştir. *BCL2* antikorunun herhangi bir klonu ile negatif saptanan 40 olgunun 27 (%67,5)'sinde sinyal elde edilebilmiş, 13 (%32,5)'ünde dokudan kaynaklı nedenlerden dolayı sonuç elde edilememiştir. Çalışmanın yapılabildiği bu vakalarda (27/%67,5) *BCL2* gen lokusunu içeren alterasyon (break veya amplifikasyon) gösterilememiştir. Sadece 4 adet kontrol grubundan değerlendirilebilen tek vakada break saptanmıştır (Şekil 4.6). *BCL2* son durumu negatif olan 7 adet vaka içerisinde 3 (%42,8) vakada *BCL2* break saptanmamış olup geri kalan 4 (%57,1) vakada da çalışmadan sonuç elde edilememiştir. *BCL2* son durum ile *BCL2* break-apart karşılaştırması aşağıda gösterilmiştir ( $p=0,812$ ) (Tablo 4.8).



**Şekil 4.6:** *BCL2* gen lokusu intakt vakanın FISH görünümü. Sadece kontrol vakasından birinde *BCL2* break saptanmıştır (1000x).

**Tablo 4.8:** *BCL2* son durum ile *BCL2* Break-apart sonuçlarının karşılaştırılması.

		<i>BCL2</i> Break-apart (N/%)		Toplam
		Yok	Sonuç Yok	
<i>BCL2</i> Son durum	Negatif	4 (%14,8)	3 (%23,1)	7 (%17,5)
	Pozitif	16 (%59,3)	7 (%53,8)	23 (%57,5)
	Parsiyel	7 (%25,9)	3 (%23,1)	10 (%25,0)
	Toplam	27 (%100,0)	13 (%100,0)	40 (%100,0)

Çalışılan 27 adet vaka içerisinde *BCL2* break-apart saptanmayanların 15 (%55,6)'i bizim vakalarımız, 12(%44,4)'si ise bölümümüze konsültasyon amacı ile başka bir mekezden gönderilen vakalardır. Çalışmayan 13 adet vakanın 4 (%30,8)'ü bizim, 9 (%69,2)'u konsültasyon amacı ile gelen vakalardır (Tablo 4.9). Yapılan Pearson ki-kare testinin sonucunda  $p=0,141$  olarak bulunmuştur. Belirgin bir anlamlılık olmamakla birlikte çalışmayan vakaların çoğunluğunun konsültasyon amacı ile gelen vakalar olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 4.9:** BCL2 Break-apart ile konsültasyon durumunun karşılaştırılması.

		Konsültasyon Durumu		Toplam
		Yok	Var	
<b>BCL2 Break-apart</b>	<b>Yok</b>	15 (%55,6)	12 (%44,4)	27 (%100,0)
	<b>Çalışmamış</b>	4 (%30,8)	9 (%69,2)	13 (%100,0)
	<b>Toplam</b>	19 (%47,5)	21 (%52,5)	40 (%100,0)

Her üç BCL2 antikoru bir arada değerlendirildiğinde BCL2 gerçek negatif vaka sayısı 7 olarak bulunmuştur ve bunların klinik verileri tablo 4.10'da gösterilmiştir. Bunların 6'sı erkek, 1'i kadın hastadır ve ortalama yaş 50,57 (aralık 42-67)'dir. Çoğunda tanısal biyopsi lenf nodundandır, özellikle inguinal bölge daha sıktır. FISH analizi ile yapılan BCL2 break-apart sonucunda 3 (%42,8) vakada BCL2 break veya amplifikasyon mevcut olmayıp, geri kalan 4 (%57,1) vakada çalışmadan sonuç elde edilememiştir.

**Tablo 4.10:** BCL2-negatif derece 1-2 FL'lı 7 hastanın klinik verileri.

Vaka	Yaş (yıl)	Cinsiyet	Kİ Tutulumu	BCL2 Break-apart	Lokalizasyon
1	48	E	MD	Yok	Aksiller LN
2	62	E	MD	Yok	LN
3	42	K	Yok	Çalışmamış	İnguinal LN
4	43	E	MD	Çalışmamış	Servikal LN
5	50	E	MD	Çalışmamış	LN
6	67	E	MD	Yok	İnguinal LN
7	42	E	Yok	Çalışmamış	İnguinal LN

Kısaltmalar: K, kadın; E, erkek; Kİ, kemik iliği; LN, lenf nodu; MD, mevcut değil.

Rutinde kullandığımız BCL klon 100/D5 antikoru ile literatürde son zamanlarda tanımlanan BCL2 klon E17 ve klon SP66 arasındaki uyumluluk değerlendirmesinde Cohen'in Kappa istatistik testinde BCL2 klon E17 için  $K=0,754$  (önemli derecede uyum) ve  $p<0,001$  şeklinde; BCL2 klon SP66 için  $K=0,570$  (orta derecede uyum) ve  $p<0,001$  olarak bulunmuştur (Tablo 4.11). Rutin BCL2 klonu ile

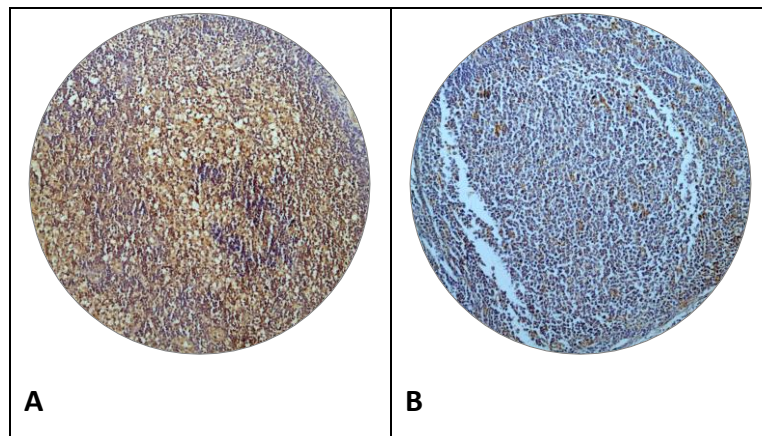
klon SP66 antikörünün daha az uyumlu olduğu gösterilmiş olup SP66 klonunun negatif sonuç açısından daha güvenilir olduğu kanısına varılmıştır.

**Tablo 4.11:** BCL2 rutin klonu ile E17 ve SP66 klonlarının uyumluluk değerlendirilmesi.

		BCL2 Klon E17 (N/%)			BCL2 Klon SP66 (N/%)		
		Negatif	Pozitif	Parsiyel	Negatif	Pozitif	Parsiyel
<b>BCL2 Klon 100/D5</b>	<b>Negatif</b>	14 (%63,6)	8 (%36,4)	0 (%0,0)	8 (%36,4)	12 (%54,5)	2 (%9,1)
	<b>Pozitif</b>	1 (%1,4)	72 (%98,6)	0 (%0,0)	1 (%1,4)	73 (%98,6)	0 (%0,0)
	<b>Parsiyel</b>	0 (%0,0)	0 (%0,0)	4 (%100,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	4(%100,0)
	<b>Toplam</b>	15 (%15,2)	80 (%80,8)	4 (%4,0)	9 (%9,0)	85 (%85,0)	6 (%6,0)

#### 4.4 EPHA7

Sitoplazmik EPHA7 ekspresyonu 101 adet tümörlü vakada değerlendirilebildi. Bunların 15 (%14,7)'i negatif, 86 (%84,3)'sı pozitif olarak bulunmuştur. EPHA7 ile BCL2 son durum karşılaştırmalı değerlendirildiğinde BCL2 son durumu negatif olan 7 vakanın 1 (%6,7)'inde EPHA7 negatif, 6 (%7,1)'sında pozitif olarak bulunmuştur. Pearson Ki-Kare testi  $p=0,892$  olarak bulunmuştur (Şekil 4.7) (Tablo 4.12).



**Şekil 4.7:** Foliküllerde EPHA7 ekspresyonu. A) EPHA7 pozitif FL. B) EPHA7 negatif FL. (A ve B; İHK, anti EPHA7 ab; 200x).

**Tablo 4.12:** BCL2 son durum ile EPHA7 karşılaştırması.

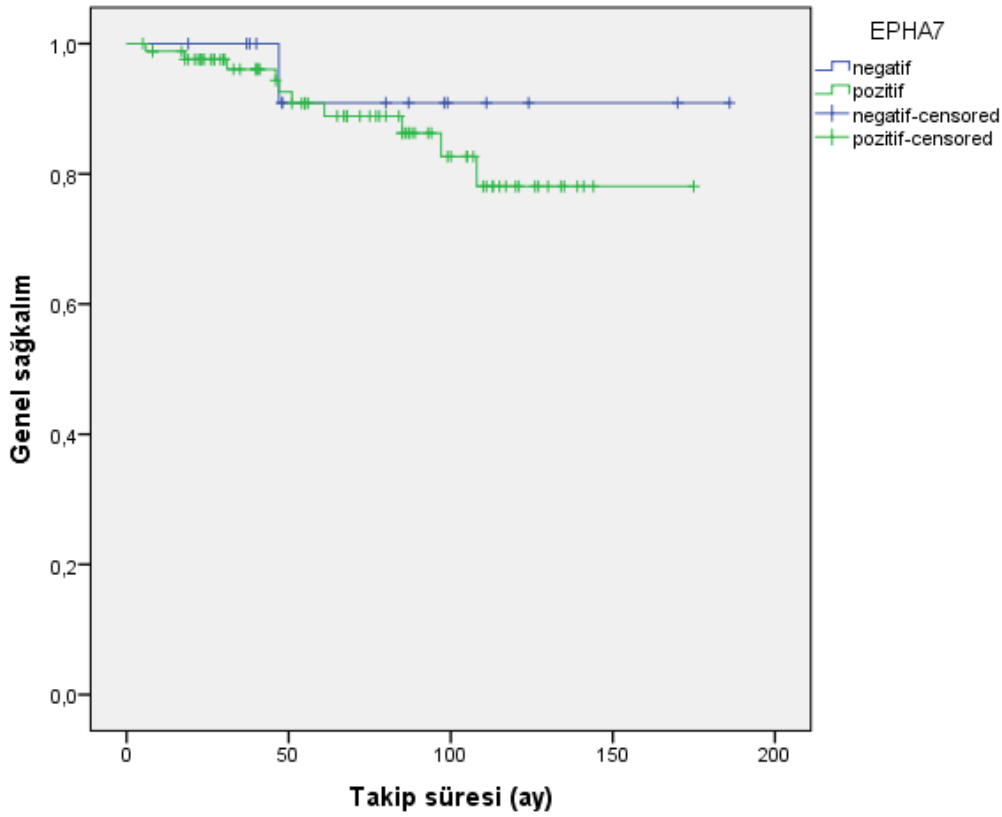
		BCL2 Son Durum (N/%)			Toplam
		Negatif	Pozitif	Parsiyel	
EPHA7	Negatif	1 (%6,7)	13 (%86,7)	1 (%6,7)	15 (%100)
	Pozitif	6 (%7,1)	70 (%82,4)	9 (%10,6)	85 (%100)
	Toplam	7 (%7,0)	83 (%83,0)	10 (%10,0)	100 (%100)

EPHA7 ile foliküler lenfoma olgularında derece karşılaştırmamızda EPHA7 negatifliği derece 1 FL'larda 3 (%20,0), derece 2 FL'larda 5 (%33,3) ve derece 1-2 FL'larda 7 (%46,7); EPHA7 pozitifliği derece 1 FL'larda 26 (%30,2), derece 2 FL'larda 34 (%39,5) ve derece 1-2 FL'larda 26 (%30,2) olarak bulunmuştur. Sonuç olarak EPHA7'nin immünohistokimyasal olarak pozitifliği vakalarımız arasında FL derecesi en yüksek olan derece 2 FL'larda daha yüksek oranda bulunmuştur ( $p=0,439$ )(Tablo 4.13).

**Tablo 4.13:** EPHA7 ile FL olgularında derece karşılaştırılması.

		Derece (N/%)			Toplam
		1	2	1-2	
EPHA7	Negatif	3 (%20,0)	5 (%33,3)	7 (%46,7)	15 (%100)
	Pozitif	26 (%30,2)	34 (%39,5)	26 (%30,2)	86 (%100)
	Toplam	29 (%28,7)	39 (%38,6)	3 (%32,7)	101 (%100)

EPHA7 pozitif ve negatif durumu billinen 101 vakanın genel sağkalım ortalamaları 162,507 aydır. Bunlardan negatif olanların 173,364 ay ve pozitif olanların 151,776 aydır. Long-Rank (Mantel-Cox) testi ile hastaların EPHA7 pozitif ve negatif durumu ile genel sağkalımları karşılaştırıldığında, EPHA7 antikoru ile immünohistokimyasal olarak pozitif saptanan grubun genel sağkalımı diğer gruba göre daha düşüktür ( $p=0,447$ ). EPHA7 durumlarının Kaplan-Meier eğrileri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8:** Hastaların EPHA7 durumu ile genel sağkalım eğrisi (Kaplan-Meier eğrisi; x: ay, y: sağkalım olasılığı, censored: takipten çıkma sebebi ölüm olmayan olgular).

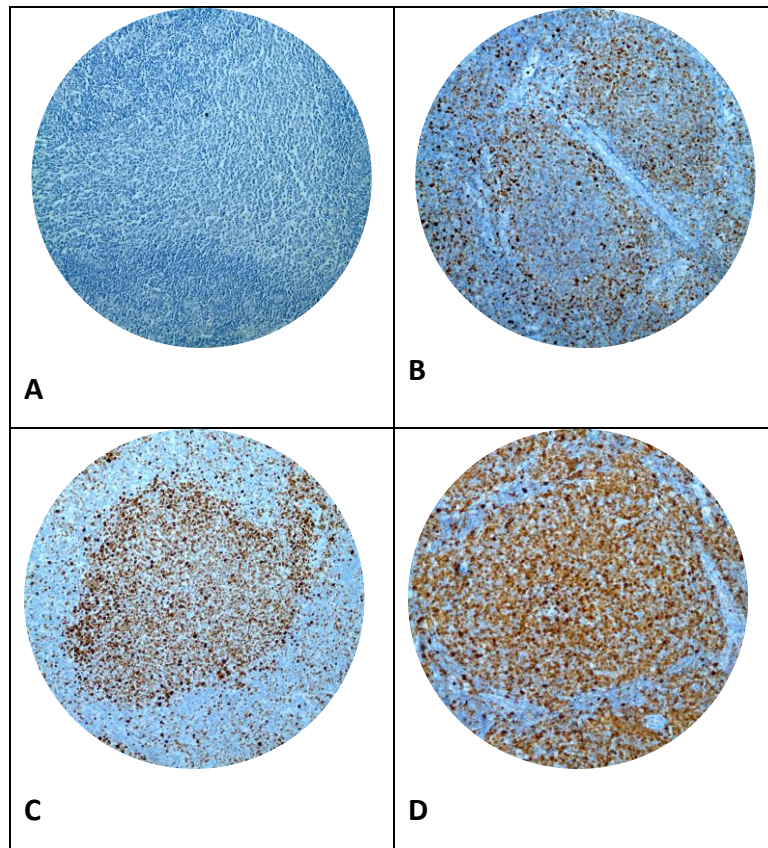
#### 4.5 EZH2

EZH2 ile neoplastik hücrelerde boyanma yoğunluğu zayıf (1+) şiddette 48 (%47,1), orta (2+) şiddette 38 (%37,3) ve kuvvetli (3+) 7 (%6,9) vakada vardır (Şekil 4.9). EZH2 ile 93 vaka içerisinde germinal merkezde bulunan sentrositlerin %80 kadarı, sentoblastların ise %40 kadarı nükleer pozitif boyanmıştır (Bu oranlar germinal merkez hücrelerinde beklenen Ki-67 değerinden daha yüksek olarak bulunmuştur).

EZH2 yoğunlukları ile BCL2 son durum karşılaştırmasında 1 (+) ve 2 (+) vakaların çoğunluğunun BCL2 son durumları pozitif olarak bulunmuştur. EZH2 3 (+) olan vakalarda BCL2 son durumda negatifliğe doğru kayma görülmüş olup negatif ve pozitif vakaların sayısı birbirine eşit olarak saptanmıştır (Tablo 4.14).



Bakılan vakalar arasında 9 (%8,8) adet vaka EZH2 için negatif olarak saptanmıştır. Bu 9 vakadan 4'ünde immünohistokimyasal boyama sırasında dokuların bir kısmının dökülmüş olduğu ve yine bu vakalardan 3 (%75)'ünde her üç BCL2 klonu ile de dökülme olduğu görülmüştür. Bu gözlem EZH2 negatifliği saptanan bu az sayıda vakanın en azından bir kısmında negatiflikte, fiksasyon sıkıntısının da rolü olabileceği şüphesini doğurmuştur ve EZH2 negatiflik oranının esasta daha da düşük olabileceği olasılığını gündeme getirmektedir.



**Şekil 4.9:** EZH2 ekspresyon yoğunlukları. A) Hiç boyanmamış olgu. B) Yoğunluk 1 (zayıf)-zorla seçilebilen boyanma. C) Yoğunluk 2 (orta)-yoğunluk 3 ve yoğunluk 1 arasındaki her türlü boyanma. D) Yoğunluk 3 (kuvvetli)-kontrol kadar kuvvetli boyanma (A, B, C ve D; İHK, anti EZH2 ab; 200x).

**Tablo 4.14:** EZH2 ile BCL2 son durum karşılaştırılması.

		BCL2 Son Durum (N/%)			Toplam
		Negatif	Pozitif	Parsiyel	
EZH2 Yoğunluk	1 (+)	1 (%2,1)	40 (%83,3)	7 (14,6)	48 (%100,0)
	2 (+)	2 (%5,3)	34 (%89,5)	2 (%5,3)	38 (%100,0)
	3 (+)	3 (%42,9)	3 (%42,9)	1 (%14,3)	7 (%100,0)
	Toplam	6 (%6,5)	77 (%82,8)	10 (%10,8)	93 (%100,0)

EZH2 yoğunluk durumu ile BCL2 klon E17 ve klon SP66 karşılaştırmasında EZH2'si kuvvetli olan olguların BCL2 son durumları, zayıf ve orta şiddette EZH2'si olan olgulara göre negatif gruba doğru geçiş göstermiştir. Bu durum sonucunda Pearson ki-kare testi klon E17 için  $p=0,054$ , klon SP66 için  $p=0,011$  şeklinde anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.15).

**Tablo 4.15:** EZH2 yoğunluk durumu ile BCL2 E17 ve SP66 klonlarının karşılaştırılması.

		BCL2 Klon E17 (N/%)			BCL2 Klon SP66 (N/%)		
		Negatif	Pozitif	Parsiyel	Negatif	Pozitif	Parsiyel
EZH2 Yoğunluk	Zayıf	5 (%10,4)	40 (%83,3)	3 (%6,2)	2 (%4,2)	43 (89,6)	3 (6,2)
	Orta	6 (%15,8)	32 (%84,2)	0 (%0,0)	3 (%7,9)	33 (%86,8)	2 (%5,3)
	Kuvvetli	3 (%42,9)	3 (%42,9)	1 (%14,3)	3 (%42,9)	3 (%42,9)	1 (%14,3)
	Toplam	14 (%15,1)	75 (%80,6)	4 (%4,3)	8 (%8,6)	79 (%84,9)	6 (%6,5)

## 5. TARTIŞMA

Foliküler lenfoma non-Hodgkin lenfoma grubu içerisinde yer alan, tüm lenfomaların %20'sini oluşturan B hücreli bir lenfomadır<sup>1</sup>. Çoğu hasta tanı anında yaygın lenfadenopatiye sahiptir ve sadece 1/3 hasta tanı anında evre I ya da II olarak karşımıza çıkmaktadır<sup>2</sup>.

Uzun yıllardır hastalığın seyrini ve hastanın progresyon riskini öngörebilecek parametreler yanısıra tedaviye yanıt hakkında fikir verebilecek prediktif faktörlere yönelik arayışlar sürmektedir. Son yıllarda sayılarında belirgin artım gösteren çalışmalarda yeni hedefe yönelik tedaviler gündeme gelmeye başlamıştır. FL'ları iyileştirmek belirgin bir klinik problemdir, çünkü anti-CD20 antikoru olan ritüksimab içeren kemoterapi rejimlerine rağmen iyileşmesi çok zor olan bir lenfoma grubudur<sup>55</sup>. FL'nın çeşitli genetik lezyonlarının potansiyel yeni ilaç tedavi seçenekleri oluşturmaktadır ve bunlar içinde öncelikli hedeflerden birkaçı BCL2, EZH2 ve EPHA7'dir.

Foliküler lenfomaların çoğu sitoplazmik BCL2 eksprese ettiğinden BCL2 hedefe yönelik tedavide potansiyel hedeflerden biridir. FL genetik olarak t(14;18)(q32;q21) translokasyonu ve *BCL2* gen rearanjmanı ile karakterizedir. Düşük dereceli olarak bilinen derece 1 ve 2 foliküler lenfomaların %90'dan fazlasında bu t(14;18) bulunmaktadır<sup>40</sup>. Bu translokasyonu saptamak için FISH en sensitif ve spesifik metod olarak bilinmektedir<sup>42</sup>.

Bununla birlikte BCL2 negatif bir grup FL olduğu da bilinmektedir ve bu grup FL'ların %10-15'ini oluşturmaktadır<sup>7</sup>. Geçtiğimiz yıllarda, immünohistokimyasal olarak BCL2 negatif olan bu grup foliküler lenfomaların bir kısmında da t(14;18)(q32;q21) translokasyonu olduğu saptanmıştır<sup>76</sup>. t(14;18) translokasyonu pozitif bu vakaların bir kısmında BCL2 proteininin yalancı negatifliğine neden olan ve BCL2 proteininin standart BCL2 antikoru (klon 100/D5) ile bağlanmasını engelleyen yapısal modifikasyonlarla sonuçlanan *BCL2* missense mutasyonları gösterilmiştir<sup>77, 78</sup>. Ancak bu mutasyonların BCL2 proteinin fonksiyonunu engellemediği kaydedilmiştir<sup>169, 170</sup>. Son zamanlarda bu yalancı BCL2 negatifliğinin saptanabilmesi için BCL2 proteininin farklı kısımlarını tanıyan iki yeni antikor tanımlanmıştır: klon E17

ve SP66 antikorlarıdır<sup>79</sup>. Bu antikorların kullanılması ile t(14;18)(q32;q21) tranlokasyonu içermeyen ve gerçek BCL2 negatifliği ile karakterize grubun daha iyi tanımlanabilmesi amaçlanmıştır. Çalışmalar BCL2 E17 ve SP66 antikorları ile pozitifliğin, BCL2 geninde nokta mutasyonu ile korele olduğunu ve standart BCL2 (klon 100/D5) antikoru ile negatif vakalarda BCL2 translokasyon varlığını destekleyen iyi bir belirteç olduğunu göstermiştir<sup>79</sup>.

Biz bu çalışmada kendi FL vakalarımız arasında öncelikle BCL2 negatif grubu saptamayı amaçladık. 102 adet derece 1-2 foliküler lenfoma vakasına her üç BCL2 antikoru içeren immünohistokimyasal çalışma uygulandı. Tanı anında uygulanan rutin BCL2 klonu (100/D5) ile vakaların 22 (%21,6)'sinde negatiflik mevcuttu. Bu negatiflik oranının literatürde bildirilenden (%10-15) daha yüksek olduğu dikkati çekti. Ancak alternatif diğer iki BCL2 klonu kullanıldığında bu oranın düştüğü kaydedildi. Klon E17 ile negatif olan 15 (%14,7), klon SP66 negatif olan 9 (%8,8) ve tüm klonların birlikte değerlendirmesinde BCL2 negatif olan 7 (%6,8) vaka saptandı.

BCL2 gen statüsünü belirlemek için herhangi bir klonla BCL2 negatif veya parsiyel pozitif sonuç alınmış tüm vakalara uygulanan FISH çalışmasında ise 40 vaka içerisinden sonuç alınabilen 27 vakanın hiçbirinde BCL2 geninde break veya amplifikasyon saptanmadı. BCL2 gen lokusu intakt olan bu 27 vakanın 4 (%14,8)'ü her üç BCL2 antikoru ile negatif, 16 (%59,3)'sı bu 3 klondan en az biri ile pozitif ve 7 (%25,9)'si parsiyel pozitif bulunmuştur. Her üç BCL2 antikoru ile negatif saptanan 7 vakanın ise 3 (%42,8)'ünde BCL2 break veya amplifikasyon mevcut değilken, geri kalan 4 (%57,1)'ünde çalışmadan sonuç elde edilememiştir.

Her üç BCL2 klonunu karşılaştırdığımızda rutinde kullanılan klon 100/D5'in negatifliğinin fazla olduğu ve fiksasyondan aşırı derecede etkilendiği gözlemlenmiştir. Rutin BCL2 klonu ile negatif 22 vakanın sadece 7'si (%31,8) her üç antikoru ile olan boyanmalar göz önüne alınarak yapılan son değerlendirmede negatif olarak bulunmuştur. BCL2 klon SP66 ile negatif bulunan 9 vakanın ise 7 (%77,8)'si her üç antikoru ile olan boyanmalar göz önüne alınarak yapılan son değerlendirmede negatif olarak bulunmuştur. Klon SP66 ile negatif olup son durumu negatif değerlendirilmeyen 2 vakanın birinde klon E17 ve klon 100/D5 birlikte pozitifdir; diğerinde ise klon E17 parsiyel pozitif, klon 100/D5 ise negatiftir. Bu çalışmalar sonucunda BCL2 SP66 klonunun fiksasyondan en az etkilenen ve yalancı negatiflik

oranının az olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Her üç antikor kullanılarak vakaların 83 (%81,3)'ü pozitif, 10 (%9,8)'u parsiyel pozitif ve 7 (%6,8)'si negatif olarak bulunmuştur. FISH ile hiçbirinde *BCL2* break veya amplifikasyon gösterilmemiştir.

Literatürde 240 adet derece 1-2 foliküler lenfoma ile yapılan çalışmalarda bunların 22 (%9,2)'sinde standart *BCL2* antikoruna (klon 100/D5) negatif bulunmuş olup bu 22 vaka içerisinde 12 (%55) vakada *BCL2* gen lokusunda "break" gösterilmiştir. Bu 12 vakanın 1'i hariç diğerlerinin hepsinde (%4,5) alternatif *BCL2* klonları olan E17 ve SP66 belirteçleri ile *BCL2* pozitifliği gösterilmiş ve *BCL2* missense mutasyonu saptanmıştır. Geri kalan 10 (%4) vakada ise alternatif *BCL2* antikorlarıyla pozitiflik saptanmadığı gibi FISH ile *BCL2* lokusunda break de gösterilememiştir.

Bizim vakalarımız arasında gerek rutin klon (100/D5) ile gerekse E17 ve SP66 klonları ile negatiflik oranlarımız, bu çalışmadakinden daha fazla bulunmuştur. İlginç olarak FISH ile immünohistokimyasal olarak *BCL2* negatifliği olan vakalardan oluşan grupta vakaların hiçbirinde *BCL2* geninde break veya amplifikasyon saptanmamıştır. Bu gözlem bizim vaka popülasyonumuzda t(14;18)(q32;q21) translokasyonunun daha az sıklıkta görülüyor olabileceği olasılığını da akla getirmektedir. Literatürde Asya'lı toplumlardaki FL'larda t(14;18)(q32;q21) translokasyonunun Avrupa toplumlarında bildirilenden daha düşük olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur<sup>48</sup>. Bu amaçla FL vaka grubumuzun tümünün *BCL2* break'i ve spesifik olarak t(14;18)(q32;q21) translokasyonu açısından araştırılması düşünülebilir.

Bir diğer çalışmada *BCL2* ve CD10 ile immünofenotipik *BCL2* alt grupları tanımlanmaya çalışılmıştır. Tanımlanan 4 altgruptan birincisi olan CD10 pozitif/*BCL2* pozitif klasik FL'da *BCL2* rearanjmanı vakaların %68'inde; ikincisi olan CD10 pozitif/*BCL2* negatif FL'da *BCL2* rearanjmanı vakaların %4'ünde; üçüncüsü olan CD10 negatif/*BCL2* pozitif FL'da *BCL2* rearanjmanı vakaların %38'inde ve sonuncusu olan CD10 negatif/*BCL2* negatif FL'ların hiçbirinde genetik olarak *BCL2* rearanjmanı gösterilememiştir<sup>47</sup>.

t(14;18) translokasyonu olan FL'larda, immünohistokimyasal olarak *BCL2* protein yokluğunun *BCL2* gen mutasyonu ile açıklanması ilk olarak Schraders ve ark.<sup>78</sup> tarafından gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki çalışmada Masir ve ark.<sup>171</sup> t(14;18)'e sahip *BCL2* ile yalancı negatif olan 7 adet FL vakası raporlamışlar ve bunların 4'ünde *BCL2* mutasyonu saptamışlardır. Diğer 3 vakada çalışılan alanlarda mutasyon

saptanmamıştır. BCL2 klon SP66 antikoru standart BCL2 antikoru ile negatif olan ve *BCL2* translokasyonu bulunan vakaların yerini tutabilecek en iyi belirteç olarak saptanmıştır. Bu mutasyonların BCL2'nin fonksiyonel olarak önemli olan BH2 alanının dışında olduğu ancak BCL2'nin negatif regülatörü olan p53'ün bağlanma alanını kapsadığı saptanmıştır<sup>169, 170, 172</sup>. Dolayısıyla bu mutasyonların p53 bağlanmasını engelleyerek BCL2'nin antiapoptotik aktivitesinde artışla sonuçlanabileceği ön görülmektedir. Bu gibi bir durum bizim vakalarımızdaki gibi *BCL2* geni wild type olan FL'larda immünohistokimyasal olarak artmış BCL2 varlığı ile ilişkili olabilir, bu hipotezin test edilmesine yönelik çalışmalar gerekmektedir.

GM B hücrelerindeki BCL2 ekspresyonu, FL'nin başlangıçta saptanan anomalisidir. BCL2 artışı tümör gelişim veya progresyonu için yeterli değildir ve ek genetik olayları gerektirir<sup>56</sup>. *EZH2* mutasyonları FL'larda erken dönemde meydana geldiği düşünülen değişikliklerden ve hedefe yönelik tedavide kullanılabilecek potansiyel hedeflerden bir diğeridir<sup>48, 143</sup>. *EZH2* mutasyonlarının germinal merkez kökenli B hücre neoplazilerinde t(14;18)'den sonra en sık görülen genetik değişiklik olduğu gösterilmiştir<sup>59</sup>. Germinal merkez reaksiyonu sırasında *EZH2*'nin ekspresyonunun arttığı görülmektedir<sup>141</sup> ve GM B hücre tipindeki DBBHL ile FL patogenezinde önemli bir rol oynayan *EZH2*<sup>63</sup>, polycomb baskılayıcı kompleks 2'nin katalitik ünitesinde bulunan lenfomadaki en karakteristik histon-modifikasyon genidir<sup>60</sup>. *EZH2*'nin aktive edici mutasyonları ile B hücre proliferasyonunun desteklendiği düşünülmektedir, ancak bunun tam olarak hangi mekanizma ile gerçekleştiği tartışmalıdır. Çünkü çalışmalar *EZH2* mutasyonları ile hedef metilasyon bölgelerindeki metilasyon seviyeleri veya *EZH2* mRNA seviyeleri arasında net bir ilişki gösterememiştir<sup>63, 173</sup>. *EZH2* mutasyonu yakın zamanda FL dışında GM B hücre fenotipinde DBBHL, diğer düşük dereceli NHL'larda, GM fenotipinden yoksun tüm T hücreli lenfomalarda, melanom<sup>145</sup>, prostat<sup>75, 146</sup>, meme ve endometrium karsinomlarında da bulunmuştur.

Literatürde bir çalışmada 221 FL lenf nodu örneğinden 26 (%12)'sında *EZH2* Y641 mutasyonu saptanmıştır<sup>48</sup>. Mutasyon sıklığının düşük dereceli FL'larda, BCL2 ekspresyonu olan FL'larda ve *BCL2* rearranjanı olan vakalarda daha da yüksek olduğu (%23-25) kaydedilmiştir<sup>48</sup>. Daha az sayıda FL vakasını ele alan bir başka çalışmada ise yüksek dereceli FL'larda düşük derecelilere oranla daha yüksek oranda

eksprese olduğu saptanmıştır [Derece 1 FL 11/19 vaka (%57.8), derece 3 FL 7/8 vaka (%87.5)]. TMA bloklarında EZH2 ekspresyon durumuna bakılmıştır ve vakaların EZH2 mutasyon statüsüne bakılmaksızın zayıftan kuvvetliye kadar değişen değerlerde heterojen ekspresyon seviyelerine sahip oldukları bulunmuştur<sup>63, 173</sup>. NGS ile yapılan bir diğer çalışmada ise EZH2 mutasyonlarının FL vakalarının %25'inden fazlasında mevcut olduğu gösterilmiştir. EZH2 mutasyonu genel sağkalım veya transformasyon zamanı ile ilişkili değildir<sup>173</sup>.

Bizim çalışmada EZH2 antikoru ile folikül merkezlerinde neoplastik hücrelerin ekspresyon seviyesi değerlendirilmiştir. Normal germinal merkezlerde literatürde de bildirildiği gibi<sup>174</sup> Ki-67 ile korele bir boyanma izlenirken, düşük dereceli foliküler lenfomalardan oluşan grubumuzda değişken derecelerde olmakla birlikte neoplastik hücrelerin büyük çoğunluğunda ekspresyon olduğu görülmüştür (düşük dereceli bir FL'da beklenen Ki-67'den çok daha fazla). 102 vakamızın 93 (%91,2)'ünde EZH2 antikoru ile zayıftan kuvvetliye kadar değişen yoğunlukta ancak yüksek yüzdede pozitiflik elde edilmiştir (boyanma yoğunluklarına göre dağılımları: zayıf 48 (%47,1), orta 38 (%37,3) ve kuvvetli 7 (%6,9) vaka). Yüksek orandaki bu pozitifliğin BCL2 ekspresyonu olmayan vakalarda da geçerliliğini koruduğu saptanmıştır. Bu nedenle tanısı zor bu grupta EZH2'nin, BCL2 pozitif FL'larda BCL2'nin germinal merkezin anormal olduğunu ve tanıyı desteklemesi gibi, tanıya alternatif bir destek oluşturabileceği düşünülmüştür.

EPHA7 de potansiyel terapötik bir ajan olarak lenfoma tedavisinde umut vaad edicidir<sup>154, 157, 158</sup>. Bugünkü bilgiler ışığına EPHA7 normal B hücrelerinden salınarak oto-parakrin olarak etkir, EPHA2'ye bağlanarak bu reseptörün ERK ve SRC kinazlar üzerinden sinyal iletimini bloke eder. Bu şekilde bir çeşit tümör süpresör olarak fonksiyon gösterdiği gösterilmiştir<sup>59</sup> ve bu nedenle reaktivasyonunun güçlü teröpatik etkileri ortaya çıkarabileceği düşünülmektedir<sup>59, 175-177</sup>.

Literatürde FL'larda TMA ile yapılan tek immünohistokimyasal çalışmada FL'ların %72'sinde EPHA7'nin ekspresyonunun tamamen kaybolduğu rapor edilmiştir. EPHA7 proteinin ekspresyonu RT-PCR analiz sonuçları ile korele edilmiştir. RT-PCR sonuçlarında FL hücrelerinde EPHA7 mRNA seviyelerinde, normal GM B hücrelerine ve tonsil dokularına oranla azalma gösterilmiştir<sup>59</sup>. EPHA7 kaybı 6q delesyonu ile de korele bulunmuştur<sup>59</sup>. Bizim çalışmamızda 101 vaka içerisinde 15 (%14,7)'inde EPHA7

negatif, 86 (%84,3)'sında pozitif sonuç elde edilmiştir. 2 vakadan dokudan kaynaklı sebeplerden ötürü sonuç alınamamıştır. Literatürdeki çalışmada EPHA7 yokluğu %72 iken bizde %14,7 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada yüksek dereceli foliküler lenfomaların da dahil edilmiş olduğu dikkati çekmektedir, ancak EPHA7 kaybının grade ile ilişkisinin bilgisi verilmemiştir. 6q delesyonları ile paralel olarak EPHA7 kaybının FL'larda daha ileri dönemlerde görülen bir değişiklik olabileceği ve bu nedenle düşük dereceli FL'lardan oluşan grubumuzda kaybın literatürdeki bu tek çalışmanınkinden daha düşük çıkmış olabileceği olası bir açıklamadır.

Özetle BCL2, EZH2 ve EPHA7 FL'nın ileride hedefe yönelik potansiyel tedavi seçenekleri arasında yer almaktadır. Bu belirteçlerinin ekspresyonunun immünohistokimya gibi kolay uygulanabilir ve maliyeti düşük rutin bir yöntemle bakıldığı bu gibi çalışmalarda artış izlenmesi, bu ve takip edecek benzer çalışmaların sonuçları ışığında ileride hem prognostik hem de tedavi yönlendirici olarak FL vakalarında rutinde kullanılabileceği beklenmektedir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1- Literatür bilgileri ile uyumlu olarak kemik iliği tutulumu olan FL hastalarının kemik iliği tutulumu olmayan FL hastalarına göre daha kısa sağkalıma sahip oldukları görülmüştür.

2- BCL2'nin farklı klonları ile BCL2 negatif FL oranının farklılıklar gösterdiği görülmüştür. Bu nedenle herhangi bir klonla BCL2 negatif saptanan olguların mümkünse diğer BCL2 klonları ile de değerlendirilmesi bu grubun daha net tanımlanabilmesi için gerekmektedir.

3- Çalışmada yer alan üç BCL2 antikoru içerisinde SP66 klonunun aralarında fiksasyondan en az etkilenen ve en yüksek pozitiflik oranına sahip olan olduğu görülmüştür. Bu nedenle tanısal açıdan sıkıntılı olan "BCL2 negatif FL" grubunu daraltmak ve tanısal sıkıntıyı azaltmak için bu klon rutinde tercih edilebilir.

4- Herhangi bir BCL2 klonu ile negatif veya parsiyel pozitif olan vakalara *BCL2* geninin durumunu saptamaya yönelik yapılan FISH çalışmasından sonuç elde edilen vakaların hiçbirinde BCL2 ekspresyonunda artışa neden olabilecek *BCL2* break veya amplifikasyon varlığı saptanmamıştır. Bu durum BCL2 translokasyon sıklığının bizim vaka grubumuzda Batı toplumlarında bildirileninkinden daha az olabileceği olasılığını akla getirmektedir (bazı Asya toplumlarından bildirilen daha düşük oranlara benzer olarak). Bu durumun saptanabilmesi için *BCL2* break varlığının saptanmasına yönelik FISH çalışmasının tüm FL vaka grubuna genişletilmesi ve vakalarımızın spesifik olarak t(14:18) translokasyonuna yönelik problemlerle de değerlendirilmesi önerilir.

5- FISH ile değerlendirilen vaka grubunun (vakaların yaklaşık %40'ı) hiçbirinde *BCL2* gen anomali saptanmamış olması immünohistokimyasal olarak farklı klonlarla izlenen BCL2 pozitifliğinden sorumlu olabilecek artmış BCL2 protein aktivitesinin altında farklı mekanizmaların yer aldığını düşündürmektedir. Yine bu amaçla da *BCL2*

break veya t(14:18) translokasyon varlığının tüm vaka gurubunda araştırılması ve BCL2 protein aktivitesinde artışa neden olabilecek olası diğer mekanizmalara yönelik araştırmaların yapılması gerekmektedir.

6- FL vaka gurubumuzda immünohistokimyasal olarak EZH2 ekspresyonunu çok yüksek oranda pozitif bulduk. Bu da literatürdeki hipotezlerle uyumlu olarak bu proteinin aktivitesinin FL'larda erken dönemden itibaren izlenen patogenetik bir sürecin bir parçası olabileceğini destekleyebilir.

7- EZH2 ekspresyonu gerek BCL2 pozitif, gerekse BCL2 negatif her iki grupta da mevcuttu. Bu nedenle EZH2'nin BCL2 negatif grupta foliküllerin anormal olduklarına dair BCL2'ye alternatif olarak kullanılabilceğini düşündük. Bu konuda daha geniş kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

8- FL vakalarında immünohistokimyasal olarak yüksek orandaki EZH2 pozitifliği ileride EZH2'yi hedefleyen ajanlarla tedaviyi yönlendirmede rutinde kullanılabilir. Bu kapsamda EZH2 blokörlerinin FL'da kullanımı ile ilgili yeni yeni başlayan çalışmaların sonuçları aydınlatıcı olacaktır.

9- EPHA7 kaybı vaka grubumuzda literatürdeki mevcut tek çalışmadakinden daha düşük oranda bulundu. Bu durumun vaka grubumuza sadece düşük dereceli FL'ları dahil etmiş olmamızdan kaynaklanıyor olabileceği ve EPHA7 kaybının FL'da daha ileri dönemde görülen bir anomali olabileceğini akla getirdi. Yüksek dereceli FL vakalarının da dahil edileceği daha kapsamlı bir çalışma ile bu olasılığın değerlendirilmesi düşünülebilir.

## KAYNAKLAR

1. Malcovati L, Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglino E, Passamonti F, Arcaini L, Maffioli M, Bernasconi P, Lazzarino M, Cazzola M: Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005, 23:7594-603.
2. Moreau EJ ME, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, Seon BK, Catovsky O: Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *American journal of clinical pathology* 1997, 108:378-82.
3. Lorsbach RB S-S, Moore J, Banks PM, Hasserjian RP, Sandlund JT, Behm FG: Clinicopathologic analysis of follicular lymphoma occurring in children. *Blood* 2002, 99:1959-64.
4. Pinto A HR, Grant LH, Trevenen CL, Berard CW: Follicular lymphomas in pediatric patients. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 1990, 3:308-13.
5. Patsalides AD AG, Hedge U, Janik J, Grant N, Jaffe ES, Dwyer A, Patronas NJ, Wilson WH: Lymphomatoid granulomatosis: abnormalities of the brain at MR imaging. *Radiology* 2005, 237:265-73.
6. SH S: Pediatric follicular lymphomas, marginal zone lymphomas, and marginal zone hyperplasia. *American journal of clinical pathology* 2005, 122 Suppl:S98-109.
7. Swerdlow SH CE, Harris N, et al eds.: *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*: Lyon: IARC, 2008.
8. Nishiu M TY, Nakatsuka S, Takakuwa T, Iizuka N, Hoshida Y, Ikeda J, Iuchi K, Yanagawa R, Nakamura Y, Aozasa K: Distinct pattern of gene expression in pyothorax-associated lymphoma (PAL), a lymphoma developing in long-standing inflammation. *Cancer science* 2004, 95:828-34.
9. Harris NL JE, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD: *World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee*

- meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1999, 17:3835-49.
10. Arnulf B C-BC, Delfau-Larue MH, Lavergne-Slove A, Bosq J, Wechsler J, Wassef M, Matuchansky C, Epardeau B, Stern M, Bagot M, Reyes F, Gaulard P, d'Agay MF, Peuchmaur M, et al: Nonhepatosplenic gamma delta T-cell lymphoma: a subset of cytotoxic lymphomas with mucosal or skin localization. *Blood* 1998, 91:1723-31.
  11. Cong P RM, Teruya-Feldstein J, Sorbara L, Pittaluga S, Jaffe ES: In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. *Blood* 2002, 99:3376-82.
  12. Goodlad JR BP, Hamilton O, Hollowood K: Follicular lymphoma with marginal zone differentiation: cytogenetic findings in support of a high-risk variant of follicular lymphoma. *Histopathology* 2003, 42:292-8.
  13. Nathwani BN AJ, Armitage JO, Cavalli F, Diebold J, Drachenberg MR, Harris NL, MacLennan KA, Muller-Hermelink HK, Ullrich FA, Weisenburger DD: Clinical significance of follicular lymphoma with monocytoid B cells. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Human pathology* 1999, 30:263-8.
  14. Torlakovic EE AH, Heim S: A marginal zone phenotype in follicular lymphoma with t(14;18) is associated with secondary cytogenetic aberrations typical of marginal zone lymphoma. *The Journal of pathology* 2006, 209:258-64.
  15. Robetorye RS BS, Medeiros LJ, Elenitoba-Johnson KS: Follicular lymphoma with monocytoid B-cell proliferation: molecular assessment of the clonal relationship between the follicular and monocytoid B-cell components. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2000, 80:1593-9.
  16. 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, 49:2112-35.
  17. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, et al.: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994, 84:1361-92.

18. Hicks EB, Rappaport H, Winter WJ: Follicular lymphoma; a re-evaluation of its position in the scheme of malignant lymphoma, based on a survey of 253 cases. *Cancer* 1956, 9:792-821.
19. Anderson JR, Vose JM, Bierman PJ, Weisenberger DD, Sanger WG, Pierson J, Bast M, Armitage JO: Clinical features and prognosis of follicular large-cell lymphoma: a report from the Nebraska Lymphoma Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1993, 11:218-24.
20. Gallamini A, Hutchings M, Rigacci L, Specht L, Merli F, Hansen M, Patti C, Loft A, Di Raimondo F, D'Amore F, Biggi A, Vitolo U, Stelitano C, Sancetta R, Trentin L, Luminari S, Iannitto E, Viviani S, Pierri I, Levis A: Early interim 2-[<sup>18</sup>F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography is prognostically superior to international prognostic score in advanced-stage Hodgkin's lymphoma: a report from a joint Italian-Danish study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007, 25:3746-52.
21. Glick JH, Barnes JM, Ezdinli EZ, Berard CW, Orlow EL, Bennett JM: Nodular mixed lymphoma: results of a randomized trial failing to confirm prolonged disease-free survival with COPP chemotherapy. *Blood* 1981, 58:920-5.
22. Jones SE, Fuks Z, Bull M, Kadin ME, Dorfman RF, Kaplan HS, Rosenberg SA, Kim H: Non-Hodgkin's lymphomas. IV. Clinicopathologic correlation in 405 cases. *Cancer* 1973, 31:806-23.
23. Kantarjian HM, McLaughlin P, Fuller LM, Dixon DO, Osborne BM, Cabanillas FF: Follicular large cell lymphoma: analysis and prognostic factors in 62 patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1984, 2:811-9.
24. Longo DL, Young RC, Hubbard SM, Wesley M, Fisher RI, Jaffe E, Berard C, DeVita VT, Jr.: Prolonged initial remission in patients with nodular mixed lymphoma. *Annals of internal medicine* 1984, 100:651-6.
25. Martin AR, Weisenburger DD, Chan WC, Ruby EI, Anderson JR, Vose JM, Bierman PJ, Bast MA, Daley DT, Armitage JO: Prognostic value of cellular proliferation and histologic grade in follicular lymphoma. *Blood* 1995, 85:3671-8.

26. Bartlett NL, Rizeq M, Dorfman RF, Halpern J, Horning SJ: Follicular large-cell lymphoma: intermediate or low grade? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1994, 12:1349-57.
27. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 1997, 89:3909-18.
28. Metter GE, Nathwani BN, Burke JS, Winberg CD, Mann RB, Barcos M, Kjeldsberg CR, Whitcomb CC, Dixon DO, Miller TP, et al.: Morphological subclassification of follicular lymphoma: variability of diagnoses among hematopathologists, a collaborative study between the Repository Center and Pathology Panel for Lymphoma Clinical Studies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1985, 3:25-38.
29. Nathwani BN, Metter GE, Miller TP, Burke JS, Mann RB, Barcos M, Kjeldsberg CR, Dixon DO, Winberg CD, Whitcomb CC, et al.: What should be the morphologic criteria for the subdivision of follicular lymphomas? *Blood* 1986, 68:837-45.
30. Mann RB, Berard CW: Criteria for the cytologic subclassification of follicular lymphomas: a proposed alternative method. *Hematological oncology* 1983, 1:187-92.
31. Katzenberger T OG, Klein T, Kalla J, Muller-Hermelink HK, Ott MM: Cytogenetic alterations affecting BCL6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3B with a diffuse large B-cell component. *The American journal of pathology* 2004, 165:481-90.
32. Ott G KT, Lohr A, Kindelberger S, Rudiger T, Wilhelm M, Kalla J, Rosenwald A, Muller JG, Ott MM, Muller Hermelink HK: Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood* 2002, 99:3806-12.
33. Bosga-Bouwer AG, van den Berg A, Haralambieva E, de Jong D, Boonstra R, Kluin P, van den Berg E, Poppema S: Molecular, cytogenetic, and immunophenotypic characterization of follicular lymphoma grade 3B; a separate entity or part of the spectrum of diffuse large B-cell lymphoma or follicular lymphoma? *Human pathology* 2006, 37:528-33.
34. Finn LS VO, Belasco JB, Snyder H, Huebner O, Sorbara L, Raffeld M, Jaffe ES, Salhany KE: Primary follicular lymphoma of the testis in childhood. *Cancer* 1999, 85:1626-35.

35. SH S: Pediatric follicular lymphomas, marginal zone lymphomas, and marginal zone hyperplasia. *American journal of clinical pathology* 2004, 122:S98-109.
36. Hans CP WD, Vose JM, Hock LM, Lynch JC, Aoun P, Greiner TC, Chan WC, Bociek RG, Bierman PJ, Armitage JO: A significant diffuse component predicts for inferior survival in grade 3 follicular lymphoma, but cytologic subtypes do not predict survival. *Blood* 2008, 101:2363-7.
37. Klapper W: Pathobiology and diagnosis of follicular lymphoma. *Seminars in Diagnostic Pathology* 2011, 28:146-60.
38. Dave SS WG, Tan B, et al: Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *The New England journal of medicine* 2004, 351:2159-69.
39. Dogan A DM, Aiello A, et al: Follicular lymphomas contain a clonally linked but phenotypically distinct neoplastic B-cell population in the interfollicular zone. *Blood* 1998, 91:4708-14.
40. Horsman DE, Gascoyne RD, Coupland RW, Coldman AJ, Adomat SA: Comparison of cytogenetic analysis, southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14; 18) in follicular lymphoma. *American journal of clinical pathology* 1995, 103:472-8.
41. Montoto S, Lopez-Guillermo A, Colomer D, Esteve J, Bosch F, Ferrer A, Villamor N, Moreno C, Campo E, Montserrat E: Incidence and clinical significance of bcl-2/IgH rearrangements in follicular lymphoma. *Leukemia & lymphoma* 2003, 44:71-6.
42. Vaandrager JW, Schuurung E, Raap T, Philippo K, Kleiverda K, Kluin P: Interphase FISH detection of BCL2 rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes. *Genes, chromosomes & cancer* 2000, 27:85-94.
43. Ott G, Katzenberger T, Lohr A, Kindelberger S, Rudiger T, Wilhelm M, Kalla J, Rosenwald A, Muller JG, Ott MM, Muller-Hermelink HK: Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood* 2002, 99:3806-12.
44. Matsumoto Y, Nomura K, Matsumoto S, Ueda K, Nakao M, Nishida K, Sakabe H, Yokota S, Horiike S, Nakamine H, Nakamura S, Taniwaki M: Detection of t(14;18) in follicular lymphoma by dual-color fluorescence in situ hybridization on paraffin-embedded tissue sections. *Cancer genetics and cytogenetics* 2004, 150:22-6.

45. Naresh KN: Nodal marginal zone B-cell lymphoma with prominent follicular colonization - difficulties in diagnosis: a study of 15 cases. *Histopathology* 2008, 52:331-9.
46. Guo Y, Karube K, Kawano R, Suzumiya J, Takeshita M, Kikuchi M, Huang GS, Li Q, Ohshima K: Bcl2-negative follicular lymphomas frequently have Bcl6 translocation and/or Bcl6 or p53 expression. *Pathology international* 2007, 57:148-52.
47. Marafioti T, Copie-Bergman C, Calaminici M, Paterson JC, Shende VH, Liu H, Baia M, Ramsay AD, Agostinelli C, Briere J, Clear A, Du MQ, Piccaluga PP, Masir N, Nacheva EP, Sujobert P, Shanmugam K, Grogan TM, Brooks SP, Khwaja A, Ardeshtna K, Townsend W, Pileri SA, Haioun C, Linch D, Gribben JG, Gaulard P, Isaacson PG: Another look at follicular lymphoma: immunophenotypic and molecular analyses identify distinct follicular lymphoma subgroups. *Histopathology* 2013, 62:860-75.
48. Guo S, Chan JK, Iqbal J, McKeithan T, Fu K, Meng B, Pan Y, Cheuk W, Luo D, Wang R, Zhang W, Greiner TC, Chan WC: EZH2 mutations in follicular lymphoma from different ethnic groups and associated gene expression alterations. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014, 20:3078-86.
49. Roulland S, Lebailly P, Roussel G, Briand M, Cappellen D, Pottier D, Hardouin A, Troussard X, Bastard C, Henry-Amar M, Gauduchon P: BCL-2/JH translocation in peripheral blood lymphocytes of unexposed individuals: lack of seasonal variations in frequency and molecular features. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2003, 104:695-8.
50. Katzenberger T, Ott G, Klein T, Kalla J, Muller-Hermelink HK, Ott MM: Cytogenetic alterations affecting BCL6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3B with a diffuse large B-cell component. *The American journal of pathology* 2004, 165:481-90.
51. Tilly H, Rossi A, Stamatoullas A, Lenormand B, Bigorgne C, Kunlin A, Monconduit M, Bastard C: Prognostic value of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma. *Blood* 1994, 84:1043-9.
52. Offit K, Parsa NZ, Gaidano G, Filippa DA, Louie D, Pan D, Jhanwar SC, Dalla-Favera R, Chaganti RS: 6q deletions define distinct clinico-pathologic subsets of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1993, 82:2157-62.



53. Sander CA, Yano T, Clark HM, Harris C, Longo DL, Jaffe ES, Raffeld M: p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood* 1993, 82:1994-2004.
54. Velculescu VE: Defining the blueprint of the cancer genome. *Carcinogenesis* 2008, 29:1087-91.
55. Relander T, Johnson NA, Farinha P, Connors JM, Sehn LH, Gascoyne RD: Prognostic factors in follicular lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010, 28:2902-13.
56. Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJ: Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia* 2007, 21:18-29.
57. Gaidano G, Hauptschein RS, Parsa NZ, Offit K, Rao PH, Lenoir G, Knowles DM, Chaganti RS, Dalla-Favera R: Deletions involving two distinct regions of 6q in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 1992, 80:1781-7.
58. Nanjangud G, Rao PH, Teruya-Feldstein J, Donnelly G, Qin J, Mehra S, Jhanwar SC, Zelenetz AD, Chaganti RS: Molecular cytogenetic analysis of follicular lymphoma (FL) provides detailed characterization of chromosomal instability associated with the t(14;18)(q32;q21) positive and negative subsets and histologic progression. *Cytogenetic and genome research* 2007, 118:337-44.
59. Oricchio E, Nanjangud G, Wolfe AL, Schatz JH, Mavrakis KJ, Jiang M, Liu X, Bruno J, Heguy A, Olshen AB, Socci ND, Teruya-Feldstein J, Weis-Garcia F, Tam W, Shaknovich R, Melnick A, Himanen JP, Chaganti RS, Wendel HG: The Eph-receptor A7 is a soluble tumor suppressor for follicular lymphoma. *Cell* 2011, 147:554-64.
60. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, Johnson NA, Severson TM, Chiu R, Field M, Jackman S, Krzywinski M, Scott DW, Trinh DL, Tamura-Wells J, Li S, Firme MR, Rogic S, Griffith M, Chan S, Yakovenko O, Meyer IM, Zhao EY, Smailus D, Moksa M, Chittaranjan S, Rimsza L, Brooks-Wilson A, Spinelli JJ, Ben-Neriah S, Meissner B, Woolcock B, Boyle M, McDonald H, Tam A, Zhao Y, Delaney A, Zeng T, Tse K, Butterfield Y, Birol I, Holt R, Schein J, Horsman DE, Moore R, Jones SJ, Connors JM, Hirst M, Gascoyne RD, Marra MA: Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 2011, 476:298-303.
61. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, Wells VA, Grunn A, Messina M, Elliot O, Chan J, Bhagat G, Chadburn A, Gaidano G, Mullighan CG, Rabadan

- R, Dalla-Favera R: Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nature genetics* 2011, 43:830-7.
62. Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, Fabbri G, Grunn A, Trifonov V, Kasper LH, Lerach S, Tang H, Ma J, Rossi D, Chadburn A, Murty VV, Mullighan CG, Gaidano G, Rabadan R, Brindle PK, Dalla-Favera R: Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* 2011, 471:189-95.
  63. Morin RD, Sevenson TM, Mungall AJ, An J, Goya R et al: Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nature genetics* 2010, 42:181-5.
  64. Sneeringer CJ, Scott MP, Kuntz KW, Knutson SK, Pollock RM, Richon VM, Copeland RA: Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, 107:20980-5.
  65. Yap DB, Chu J, Berg T, Schapira M, Cheng SW, Moradian A, Morin RD, Mungall AJ, Meissner B, Boyle M, Marquez VE, Marra MA, Gascoyne RD, Humphries RK, Arrowsmith CH, Morin GB, Aparicio SA: Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood* 2011, 117:2451-9.
  66. Baylin SB, Jones PA: A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nature reviews Cancer* 2011, 11:726-34.
  67. Glas AM, Knoop L, Delahaye L, Kersten MJ, Kibbelaar RE, Wessels LA, van Laar R, van Krieken JH, Baars JW, Raemaekers J, Kluin PM, van't Veer LJ, de Jong D: Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007, 25:390-8.
  68. Leich E, Salaverria I, Bea S, Zettl A, Wright G, Moreno V, Gascoyne RD, Chan WC, Braziel RM, Rimsza LM, Weisenburger DD, Delabie J, Jaffe ES, Lister A, Fitzgibbon J, Staudt LM, Hartmann EM, Mueller-Hermelink HK, Campo E, Ott G, Rosenwald A: Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations. *Blood* 2009, 114:826-34.

69. Leich E, Zamo A, Horn H, Haralambieva E, Puppe B, Gascoyne RD, Chan WC, Braziel RM, Rimsza LM, Weisenburger DD, Delabie J, Jaffe ES, Fitzgibbon J, Staudt LM, Mueller-Hermelink HK, Calaminici M, Campo E, Ott G, Hernandez L, Rosenwald A: MicroRNA profiles of t(14;18)-negative follicular lymphoma support a late germinal center B-cell phenotype. *Blood* 2011, 118:5550-8.
70. Lawrie CH, Chi J, Taylor S, Tramonti D, Ballabio E, Palazzo S, Saunders NJ, Pezzella F, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CS: Expression of microRNAs in diffuse large B cell lymphoma is associated with immunophenotype, survival and transformation from follicular lymphoma. *Journal of cellular and molecular medicine* 2009, 13:1248-60.
71. Sander S, Bullinger L, Klapproth K, Fiedler K, Kestler HA, Barth TF, Moller P, Stilgenbauer S, Pollack JR, Wirth T: MYC stimulates EZH2 expression by repression of its negative regulator miR-26a. *Blood* 2008, 112:4202-12.
72. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, Ambesi-Impiombato A, Califano A, Migliazza A, Bhagat G, Dalla-Favera R: The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer cell* 2010, 17:28-40.
73. Zhang JG, Guo JF, Liu DL, Liu Q, Wang JJ: MicroRNA-101 exerts tumor-suppressive functions in non-small cell lung cancer through directly targeting enhancer of zeste homolog 2. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2011, 6:671-8.
74. Sander S, Klapproth K, Fiedler K, Kestler HA, Barth TF et al: MYC stimulates EZH2 expression by repression of its negative regulator miR-26a. *Blood* 2008, 112:4202-12.
75. Varambally S, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B et al: Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 2008, 322:1695-9.
76. Masir N, Campbell LJ, Jones M, Mason DY: Pseudonegative BCL2 protein expression in a t(14;18) translocation positive lymphoma cell line: a need for an alternative BCL2 antibody. *Pathology* 2010, 42:212-6.
77. Bonzheim I, Salaverria I, Haake A, Gastl G, Adam P, Siebert R, Fend F, Quintanilla-Martinez L: A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular lymphoma in situ to manifest follicular lymphoma. *Blood* 2011, 118:3442-4.

78. Schraders M, de Jong D, Kluin P, Groenen P, van Krieken H: Lack of Bcl-2 expression in follicular lymphoma may be caused by mutations in the BCL2 gene or by absence of the t(14;18) translocation. *The Journal of pathology* 2005, 205:329-35.
79. Adam P, Baumann R, Schmidt J, Bettio S, Weisel K, Bonzheim I, Fend F, Quintanilla-Martinez L: The BCL2 E17 and SP66 antibodies discriminate 2 immunophenotypically and genetically distinct subgroups of conventionally BCL2-"negative" grade 1/2 follicular lymphomas. *Human pathology* 2013, 44:1817-26.
80. Hiraga J TA, Sugimoto T, et al: Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab containing combination chemotherapies: Its prevalence and clinical significance. *Blood* 2009, 113:4885-93.
81. Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, Zhang J, Ye BH, Falini B, Louie DC, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R: BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 1995, 86:45-53.
82. Karube K, Guo Y, Suzumiya J, Sugita Y, Nomura Y, Yamamoto K, Shimizu K, Yoshida S, Komatani H, Takeshita M, Kikuchi M, Nakamura N, Takasu O, Arakawa F, Tagawa H, Seto M, Ohshima K: CD10-MUM1+ follicular lymphoma lacks BCL2 gene translocation and shows characteristic biologic and clinical features. *Blood* 2007, 109:3076-9.
83. Lai R, Weiss LM, Chang KL, Arber DA: Frequency of CD43 expression in non-Hodgkin lymphoma. A survey of 742 cases and further characterization of rare CD43+ follicular lymphomas. *American journal of clinical pathology* 1999, 111:488-94.
84. Pittaluga S, Ayoubi TA, Wlodarska I, Stul M, Cassiman JJ, Mecucci C, Van Den Berghe H, Van De Ven WJ, De Wolf-Peeters C: BCL-6 expression in reactive lymphoid tissue and in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *The Journal of pathology* 1996, 179:145-50.
85. Katzenberger T KJ, Leich E, et al: A distinctive subtype of t(14;18)-negative nodal follicular non-Hodgkin lymphoma characterized by a predominantly diffuse growth pattern and deletions in the chromosomal region 1p36. *Blood* 2009, 113:1053-61.
86. Leich E, Salaverria I, Bea S, Zettl A, Wright G, Moreno V, Gascoyne RD, Chan WC, Braziel RM, Rimsza LM, Weisenburger DD, Delabie J, Jaffe ES, Lister A, Fitzgibbon J, Staudt LM, Hartmann EM, Mueller-Hermelink HK, Campo E, Ott G, Rosenwald A: Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations. *Blood* 2009, 114:826-34.

87. Bosga-Bouwer AG vIG, Boonstra R, et al: Follicular lymphoma grade 3B includes 3 cytogenetically defined subgroups with primary t(14;18), 3q27, or other translocations: t(14;18) and 3q27 are mutually exclusive. *Blood* 2003, 101:1149-54.
88. Dogan A, Du MQ, Aiello A, Diss TC, Ye HT, Pan LX, Isaacson PG: Follicular lymphomas contain a clonally linked but phenotypically distinct neoplastic B-cell population in the interfollicular zone. *Blood* 1998, 91:4708-14.
89. Harris NL, Nadler LM, Bhan AK: Immunohistologic characterization of two malignant lymphomas of germinal center type (centroblastic/centrocytic and centrocytic) with monoclonal antibodies. Follicular and diffuse lymphomas of small-cleaved-cell type are related but distinct entities. *The American journal of pathology* 1984, 117:262-72.
90. Zuberberg LR, Medeiros LJ, Ferry JA, Harris NL: Diffuse low-grade B-cell lymphomas. Four clinically distinct subtypes defined by a combination of morphologic and immunophenotypic features. *American journal of clinical pathology* 1993, 100:373-85.
91. Lai R, Arber DA, Chang KL, Wilson CS, Weiss LM: Frequency of bcl-2 expression in non-Hodgkin's lymphoma: a study of 778 cases with comparison of marginal zone lymphoma and monocytoid B-cell hyperplasia. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 1998, 11:864-9.
92. Schrager JA, Pittaluga S, Raffeld M, Jaffe ES: Granulomatous reaction in Burkitt lymphoma: correlation with EBV positivity and clinical outcome. *The American journal of surgical pathology* 2005, 29:1115-6.
93. Wang SA WL, Hochberg EP, Muzikansky A, Harris NL, et al: Low histologic grade follicular lymphoma with high proliferation index: morphologic and clinical features. *The American journal of surgical pathology* 2005, 29:1490-6.
94. Khalidi HS, Brynes RK, Medeiros LJ, Chang KL, Slovak ML, Snyder DS, Arber DA: The immunophenotype of blast transformation of chronic myelogenous leukemia: a high frequency of mixed lineage phenotype in "lymphoid" blasts and A comparison of morphologic, immunophenotypic, and molecular findings. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 1998, 11:1211-21.
95. Wang SA, Wang L, Hochberg EP, Muzikansky A, Harris NL, Hasserjian RP: Low histologic grade follicular lymphoma with high proliferation index: morphologic and clinical features. *The American journal of surgical pathology* 2005, 29:1490-6.

96. Horning SJ, Rosenberg SA: The Natural History of Initially Untreated Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphomas. *New England Journal of Medicine* 1984, 311:1471-5.
97. Bastion Y, Sebban C, Berger F, Felman P, Salles G, Dumontet C, Bryon PA, Coiffier B: Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1997, 15:1587-94.
98. Montoto S, Davies AJ, Matthews J, Calaminici M, Norton AJ, Amess J, Vinnicombe S, Waters R, Rohatiner AZ, Lister TA: Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007, 25:2426-33.
99. Al-tourah AJ, Chhanabhai M, Gill K, Hoskins P.: Incidence, predictive factors and outcome of transformed lymphoma: a population-based study from British Columbia. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2005, 16:v64.
100. Al-Tourah AJ, Gill KK, Chhanabhai M, Hoskins PJ, Klasa RJ, Savage KJ, Sehn LH, Shenkier TN, Gascoyne RD, Connors JM: Population-based analysis of incidence and outcome of transformed non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008, 26:5165-9.
101. Conconi A, Ponzio C, Lobetti-Bodoni C, Motta M, Rancoita PM, Stathis A, Moccia AA, Mazzucchelli L, Bertoni F, Ghielmini M, Cavalli F, Zucca E: Incidence, risk factors and outcome of histological transformation in follicular lymphoma. *British journal of haematology* 2012, 157:188-96.
102. Garvin AJ, Simon RM, Osborne CK, Merrill J, Young RC, Berard CW: An autopsy study of histologic progression in non-Hodgkin's lymphomas. 192 cases from the National Cancer Institute. *Cancer* 1983, 52:393-8.
103. Carlotti E, Wrench D, Matthews J, Iqbal S, Davies A, Norton A, Hart J, Lai R, Montoto S, Gribben JG, Lister TA, Fitzgibbon J: Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma may occur by divergent evolution from a common progenitor cell or by direct evolution from the follicular lymphoma clone. *Blood* 2009, 113:3553-7.
104. Eide MB, Liestol K, Lingjaerde OC, Hystad ME, Kresse SH, Meza-Zepeda L, Myklebost O, Troen G, Aamot HV, Holte H, Smeland EB, Delabie J: Genomic alterations reveal

- potential for higher grade transformation in follicular lymphoma and confirm parallel evolution of tumor cell clones. *Blood* 2010, 116:1489-97.
105. Zelenetz AD, Chen TT, Levy R: Histologic transformation of follicular lymphoma to diffuse lymphoma represents tumor progression by a single malignant B cell. *The Journal of experimental medicine* 1991, 173:197-207.
  106. Viardot A, Barth TF, Moller P, Dohner H, Bentz M: Cytogenetic evolution of follicular lymphoma. *Seminars in cancer biology* 2003, 13:183-90.
  107. Boonstra R, Bosga-Bouwer A, Mastik M, Haralambieva E, Conradie J, van den Berg E, van den Berg A, Poppema S: Identification of chromosomal copy number changes associated with transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *Human pathology* 2003, 34:915-23.
  108. Matolcsy A, Casali P, Warnke RA, Knowles DM: Morphologic transformation of follicular lymphoma is associated with somatic mutation of the translocated Bcl-2 gene. *Blood* 1996, 88:3937-44.
  109. Lossos IS, Levy R: Higher grade transformation of follicular lymphoma: phenotypic tumor progression associated with diverse genetic lesions. *Seminars in cancer biology* 2003, 13:191-202.
  110. Freedman AS: Biology and management of histologic transformation of indolent lymphoma. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program* 2005:314-20.
  111. Lo Coco F, Gaidano G, Louie DC, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R: p53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood* 1993, 82:2289-95.
  112. Gine E, Montoto S, Bosch F, Arenillas L, Mercadal S, Villamor N, Martinez A, Colomo L, Campo E, Montserrat E, Lopez-Guillermo A: The Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) and the histological subtype are the most important factors to predict histological transformation in follicular lymphoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2006, 17:1539-45.
  113. Pinto A, Hutchison RE, Grant LH, Trevenen CL, Berard CW: Follicular lymphomas in pediatric patients. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 1990, 3:308-13.

114. Lorbach RB, Shay-Seymore D, Moore J, Banks PM, Hasserjian RP, Sandlund JT, Behm FG: Clinicopathologic analysis of follicular lymphoma occurring in children. *Blood* 2002, 99:1959-64.
115. Finn LS, Viswanatha DS, Belasco JB, Snyder H, Huebner D, Sorbara L, Raffeld M, Jaffe ES, Salhany KE: Primary follicular lymphoma of the testis in childhood. *Cancer* 1999, 85:1626-35.
116. Swerdlow SH: Pediatric follicular lymphomas, marginal zone lymphomas, and marginal zone hyperplasia. *American journal of clinical pathology* 2004, 122 Suppl:S98-109.
117. Oschlies I SI, Mahn F, et al: Pediatric follicular lymphoma—A clinico-pathological study of a population-based series of patients treated within the NHL–BFM (Berlin–Frankfurt–Munster) multicenter trials. *Haematologica* 2009, 95:253-9.
118. Lorbach RB S-SD, Moore J, et al: Clinicopathologic analysis of follicular lymphoma occurring in children. *Blood* 2002, 99:1959-64.
119. Yoshino T, Miyake K, Ichimura K, Mannami T, Ohara N, Hamazaki S, Akagi T: Increased incidence of follicular lymphoma in the duodenum. *The American journal of surgical pathology* 2000, 24:688-93.
120. Shia J, Teruya-Feldstein J, Pan D, Hegde A, Klimstra DS, Chaganti RS, Qin J, Portlock CS, Filippa DA: Primary follicular lymphoma of the gastrointestinal tract: a clinical and pathologic study of 26 cases. *The American journal of surgical pathology* 2002, 26:216-24.
121. Scarabello A, Leinweber B, Ardigo M, Rutten A, Feller AC, Kerl H, Cerroni L: Cutaneous lymphomas with prominent granulomatous reaction: a potential pitfall in the histopathologic diagnosis of cutaneous T- and B-cell lymphomas. *The American journal of surgical pathology* 2002, 26:1259-68.
122. Yamamoto S NH, Yamashita K, et al: Gastrointestinal follicular lymphoma: Review of the literature. *Journal of gastroenterology* 2010, 45:370-88.
123. Ferry JA, Fung CY, Zukerberg L, Lucarelli MJ, Hasserjian RP, Preffer FI, Harris NL: Lymphoma of the ocular adnexa: A study of 353 cases. *The American journal of surgical pathology* 2007, 31:170-84.
124. Pileri SA SE, Rosito P, et al: Primary follicular lymphoma of the testis in childhood: An entity with peculiar clinical and molecular characteristics. *Journal of clinical pathology* 2002, 55:684-8.



125. Bacon CM YH, Diss TC, et al: Primary follicular lymphoma of the testis and epididymis in adults. *The American journal of surgical pathology* 2007, 31:1050-8.
126. Bacon CM, Ye H, Diss TC, McNamara C, Kueck B, Hasserjian RP, Rohatiner AZ, Ferry J, Du MQ, Dogan A: Primary follicular lymphoma of the testis and epididymis in adults. *The American journal of surgical pathology* 2007, 31:1050-8.
127. Klapper W WH: Follicular and mantle cell lymphoma: Extranodal involvement of primarily nodal indolent B-cell lymphomas [in German]. *Der Pathologe* 2006, 28:21-8.
128. Merlini G, Stone MJ: Dangerous small B-cell clones. *Blood* 2006, 108:2520-30.
129. Hailat N, Strahler J, Melhem R, Zhu XX, Brodeur G, Seeger RC, Reynolds CP, Hanash S: N-myc gene amplification in neuroblastoma is associated with altered phosphorylation of a proliferation related polypeptide (Op18). *Oncogene* 1990, 5:1615-8.
130. Belletti B, Baldassarre G: Stathmin: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer. *Expert opinion on therapeutic targets* 2011, 15:1249-66.
131. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, Au WY, Bellei M, Brice P, Caballero D, Coiffier B, Conde-Garcia E, Doyen C, Federico M, Fisher RI, Garcia-Conde JF, Guglielmi C, Hagenbeek A, Haioun C, LeBlanc M, Lister AT, Lopez-Guillermo A, McLaughlin P, Milpied N, Morel P, Mounier N, Proctor SJ, Rohatiner A, Smith P, Soubeyran P, Tilly H, Vitolo U, Zinzani PL, Zucca E, Montserrat E: Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004, 104:1258-65.
132. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *The New England journal of medicine* 1993, 329:987-94.
133. Joos S, Granzow M, Holtgreve-Grez H, Siebert R, Harder L, Martin-Subero JI, Wolf J, Adamowicz M, Barth TF, Lichter P, Jauch A: Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosomes 2p and 9p including REL and JAK2. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2003, 103:489-95.
134. McLaughlin P, Fuller LM, Velasquez WS, Butler JJ, Hagemeister FB, Sullivan-Halley JA, Dixon DO: Stage III follicular lymphoma: durable remissions with a combined chemotherapy-radiotherapy regimen. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1987, 5:867-74.

135. Voorhees PM, Carder KA, Smith SV, Ayscue LH, Rao KW, Dunphy CH: Follicular lymphoma with a burkitt translocation--predictor of an aggressive clinical course: a case report and review of the literature. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2004, 128:210-3.
136. Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, Fisher RI, Braziel RM, Rimsza LM, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Greiner TC, Weisenburger DD, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Connors JM, Lansdorp PM, Ouyang Q, Lister TA, Davies AJ, Norton AJ, Muller-Hermelink HK, Ott G, Campo E, Montserrat E, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Yang L, Powell J, Zhao H, Goldschmidt N, Chiorazzi M, Staudt LM: Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *The New England journal of medicine* 2004, 351:2159-69.
137. Gallagher CJ, Gregory WM, Jones AE, Stansfeld AG, Richards MA, Dhaliwal HS, Malpas JS, Lister TA: Follicular lymphoma: prognostic factors for response and survival. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1986, 4:1470-80.
138. Ascani S, Zinzani PL, Gherlinzoni F, Sabattini E, Briskomatis A, de Vivo A, Piccioli M, Fraternali Orcioni G, Pieri F, Goldoni A, Piccaluga PP, Zallocco D, Burnelli R, Leoncini L, Falini B, Tura S, Pileri SA: Peripheral T-cell lymphomas. Clinico-pathologic study of 168 cases diagnosed according to the R.E.A.L. Classification. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 1997, 8:583-92.
139. De Jong D, Voetdijk BM, Beverstock GC, van Ommen GJ, Willemze R, Kluin PM: Activation of the c-myc oncogene in a precursor-B-cell blast crisis of follicular lymphoma, presenting as composite lymphoma. *The New England journal of medicine* 1988, 318:1373-8.
140. Fiedler W, Weh HJ, Zeller W, Fonatsch C, Hillion J, Larsen C, Wormann B, Hossfeld DK: Translocation (14; 18) and (8; 22) in three patients with acute leukemia/lymphoma following centrocytic/centroblastic non-Hodgkin's lymphoma. *Annals of hematology* 1991, 63:282-7.
141. van Galen JC, Dukers DF, Giroth C, Sewalt RG, Otte AP, Meijer CJ, Raaphorst FM: Distinct expression patterns of polycomb oncoproteins and their binding partners during the germinal center reaction. *European journal of immunology* 2004, 34:1870-81.

142. Velichutina I, Shaknovich R, Geng H, Johnson NA, Gascoyne RD, Melnick AM, Elemento O: EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. *Blood* 2010, 116:5247-55.
143. Bodor C, Grossmann V, Popov N, Okosun J, O'Riain C, Tan K, Marzec J, Araf S, Wang J, Lee AM, Clear A, Montoto S, Matthews J, Iqbal S, Rajnai H, Rosenwald A, Ott G, Campo E, Rimsza LM, Smeland EB, Chan WC, Braziel RM, Staudt LM, Wright G, Lister TA, Elemento O, Hills R, Gribben JG, Chelala C, Matolcsy A, Kohlmann A, Haferlach T, Gascoyne RD, Fitzgibbon J: EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. *Blood* 2013, 122:3165-8.
144. Ernst T CA, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV et al: Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nature genetics* 2010, 42:722-6.
145. Bachmann I HO, Collett K: EZH2 Expression Is Associated With High Proliferation Rate and Aggressive Tumor Subgroups in Cutaneous Melanoma and Cancers of the Endometrium, Prostate, and Breast. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2006, 24:268-73.
146. Varambally S DS, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, et al: The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002, 419:624-9.
147. Varambally S CQ, Mani R-S, Shankar S, Wang X, et al: Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 2008, 322:1695-9.
148. Russell J. H. Ryan MN, Darrell Borger, Lawrence R. Zukerberg, Judith A. Ferry et al: EZH2 Codon 641 Mutations are Common in BCL2-Rearranged Germinal Center B Cell Lymphomas. *PLoS one* 2011, 6.
149. Oricchio E, Wendel HG: Functional genomics lead to new therapies in follicular lymphoma. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2013, 1293:18-24.
150. Himanen JP, Yermekbayeva L, Janes PW, Walker JR, Xu K, Atapattu L, Rajashankar KR, Mensinga A, Lackmann M, Nikolov DB, Dhe-Paganon S: Architecture of Eph receptor clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, 107:10860-5.

151. Seiradake E, Harlos K, Sutton G, Aricescu AR, Jones EY: An extracellular steric seeding mechanism for Eph-ephrin signaling platform assembly. *Nature structural & molecular biology* 2010, 17:398-402.
152. Pasquale EB: Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 2008, 133:38-52.
153. Pasquale EB: Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nature reviews Cancer* 2010, 10:165-80.
154. Dawson DW, Hong JS, Shen RR, French SW, Troke JJ, Wu YZ, Chen SS, Gui D, Regelson M, Marahrens Y, Morse HC, 3rd, Said J, Plass C, Teitell MA: Global DNA methylation profiling reveals silencing of a secreted form of Epha7 in mouse and human germinal center B-cell lymphomas. *Oncogene* 2007, 26:4243-52.
155. Macrae M, Neve RM, Rodriguez-Viciana P, Haqq C, Yeh J, Chen C, Gray JW, McCormick F: A conditional feedback loop regulates Ras activity through EphA2. *Cancer cell* 2005, 8:111-8.
156. Noren NK, Foos G, Hauser CA, Pasquale EB: The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl-Crk pathway. *Nature cell biology* 2006, 8:815-25.
157. Holmberg J, Clarke DL, Frisen J: Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* 2000, 408:203-6.
158. Valenzuela DM, Rojas E, Griffiths JA, Compton DL, Gisser M, Ip NY, Goldfarb M, Yancopoulos GD: Identification of full-length and truncated forms of Ehk-3, a novel member of the Eph receptor tyrosine kinase family. *Oncogene* 1995, 10:1573-80.
159. Freedman A: Follicular lymphoma: 2012 update on diagnosis and management. *American journal of hematology* 2012, 87:988-95.
160. Fisher RI, LeBlanc M, Press OW, Maloney DG, Unger JM, Miller TP: New treatment options have changed the survival of patients with follicular lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005, 23:8447-52.
161. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J, Hajduk PJ, Joseph MK, Kitada S, Korsmeyer SJ, Kunzer AR, Letai A, Li C, Mitten MJ, Nettesheim DG, Ng S, Nimmer PM, O'Connor JM, Oleksijew A, Petros AM, Reed JC, Shen W, Tahir SK, Thompson CB, Tomaselli KJ, Wang B, Wendt

- MD, Zhang H, Fesik SW, Rosenberg SH: An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005, 435:677-81.
162. Davids MS, Letai A: Targeting the B-cell lymphoma/leukemia 2 family in cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012, 30:3127-35.
163. McCabe MT, Graves AP, Ganji G, Diaz E, Halsey WS, Jiang Y, Smitheman KN, Ott HM, Pappalardi MB, Allen KE, Chen SB, Della Pietra A, 3rd, Dul E, Hughes AM, Gilbert SA, Thrall SH, Tummino PJ, Kruger RG, Brandt M, Schwartz B, Creasy CL: Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, 109:2989-94.
164. McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, Liu Y, Graves AP, Della Pietra A, 3rd, Diaz E, LaFrance LV, Mellinger M, Duquenne C, Tian X, Kruger RG, McHugh CF, Brandt M, Miller WH, Dhanak D, Verma SK, Tummino PJ, Creasy CL: EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* 2012, 492:108-12.
165. Niiro H, Clark EA: Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nature reviews Immunology* 2002, 2:945-56.
166. Buggy JJ, Elias L: Bruton tyrosine kinase (BTK) and its role in B-cell malignancy. *International reviews of immunology* 2012, 31:119-32.
167. Castillo JJ, Furman M, Winer ES: CAL-101: a phosphatidylinositol-3-kinase p110-delta inhibitor for the treatment of lymphoid malignancies. *Expert opinion on investigational drugs* 2012, 21:15-22.
168. Schatz JH, Oricchio E, Puvvada SD, Wendel HG: Progress against follicular lymphoma. *Current opinion in hematology* 2013, 20:320-6.
169. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, Cruz-Gordillo P, Knoechel B, Asmann YW, Slager SL, Novak AJ, Dogan A, Ansell SM, Link BK, Zou L, Gould J, Saksena G, Stransky N, Rangel-Escareno C, Fernandez-Lopez JC, Hidalgo-Miranda A, Melendez-Zajgla J, Hernandez-Lemus E, Schwarz-Cruz y Celis A, Imaz-Rosshandler I, Ojesina AI, Jung J, Pedamallu CS, Lander ES, Habermann TM, Cerhan JR, Shipp MA, Getz G, Golub TR: Discovery and prioritization of somatic mutations in

- diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, 109:3879-84.
170. Schuetz JM, Johnson NA, Morin RD, Scott DW, Tan K, Ben-Nierah S, Boyle M, Slack GW, Marra MA, Connors JM, Brooks-Wilson AR, Gascoyne RD: BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2012, 26:1383-90.
  171. Masir N, Campbell LJ, Goff LK, Jones M, Marafioti T, Cordell J, Clear AJ, Lister TA, Mason DY, Lee AM: BCL2 protein expression in follicular lymphomas with t(14;18) chromosomal translocations. *British journal of haematology* 2009, 144:716-25.
  172. Deng X, Gao F, Flagg T, Anderson J, May WS: Bcl2's flexible loop domain regulates p53 binding and survival. *Molecular and cellular biology* 2006, 26:4421-34.
  173. Bödör C, ORC, Wrench D, Matthews J, Iyengar S, Tayyib H, Calaminici M, Clear A, Iqbal S, Quentmeier H, Drexler HG, Montoto S, Lister AT, Gribben JG, Matolcsy A, Fitzgibbon J: EZH2 Y641 mutations in follicular lymphoma. *Leukemia* 2011, 25:726-9.
  174. Abd Al Kader L, Oka T, Takata K, Sun X, Sato H, Murakami I, Toji T, Manabe A, Kimura H, Yoshino T: In aggressive variants of non-Hodgkin lymphomas, Ezh2 is strongly expressed and polycomb repressive complex PRC1.4 dominates over PRC1.2. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 2013, 463:697-711.
  175. Feldser DM, Kostova KK, Winslow MM, Taylor SE, Cashman C, Whittaker CA, Sanchez-Rivera FJ, Resnick R, Bronson R, Hemann MT, Jacks T: Stage-specific sensitivity to p53 restoration during lung cancer progression. *Nature* 2010, 468:572-5.
  176. Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek EE, Weissleder R, Jacks T: Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 2007, 445:661-5.
  177. Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW: Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 2007, 445:656-60.

**EK (İncelenen Hastalara Ait Biyopsi Numaraları)**

<b>Sıra No</b>	<b>Biyopsi Yılı</b>	<b>Biyopsi Numarası</b>
1	1999	3663
2	2000	2376
3	2000	9520
4	2000	13608
5	2001	7023
6	2001	13798
7	2002	510
8	2002	4841
9	2002	9715
10	2002	13216
11	2003	1283
12	2003	11036
13	2003	14411
14	2004	6746
15	2004	10040
16	2004	18915
17	2005	1700
18	2005	3596
19	2005	7767
20	2005	9274
21	2005	9977
22	2005	12903
23	2005	18161
24	2006	222
25	2006	10806
26	2006	11442
27	2006	11876
28	2006	12713
29	2006	16280
30	2006	19743
31	2007	1206
32	2007	8022
33	2007	10162
34	2007	11551
35	2007	12258
36	2007	15379
37	2007	15603
38	2007	17542
39	2008	1478
40	2008	3257

41	2008	3555
42	2008	7540
43	2008	8077
44	2008	9540
45	2008	12642
46	2008	14720
47	2008	17127
48	2008	21159
49	2009	1656
50	2009	2806
51	2009	3283
52	2009	5082
53	2009	7134
54	2009	11696
55	2010	4185
56	2010	4265
57	2010	4546
58	2010	7491
59	2010	7776
60	2010	9596
61	2010	12690
62	2010	13828
63	2010	16798
64	2010	17339
65	2010	18699
66	2011	1275
67	2011	7538
68	2011	8460
69	2011	9460
70	2011	9887
71	2011	10239
72	2011	11125
73	2011	11415
74	2011	13956
75	2011	17000
76	2012	857
77	2012	3368
78	2012	4995
79	2012	5767
80	2012	6405
81	2012	6916
82	2012	8275
83	2012	11675
84	2012	13046
85	2012	15298
86	2012	16364



<b>87</b>	2012	17134
<b>88</b>	2012	18466
<b>89</b>	2012	18560
<b>90</b>	2013	495
<b>91</b>	2013	3757
<b>92</b>	2013	4760
<b>93</b>	2013	8595
<b>94</b>	2013	8876
<b>95</b>	2013	12296
<b>96</b>	2013	14508
<b>97</b>	2013	17170
<b>98</b>	2014	1938
<b>99</b>	2014	2264
<b>100</b>	2014	2849
<b>101</b>	2014	4608
<b>102</b>	2014	11130