



Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomada Germinal Merkez B Hücre-Benzeri ve Germinal Merkez-Dışı B Hücre-Benzeri Orijinin Araştırılması

Investigation of Germinal Center B Cell-Like and Germinal Non-Center B Cell-Like Origin in Diffuse Large B-Cell Lymphoma

 Tuğba ÖZÇEREZCİ^a,
 Yılmaz BAŞ^a

^aPatoloji Kliniği,
Hitit Üniversitesi
Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Çorum, TÜRKİYE

Received: 07 Nov 2018

Received in revised form: 18 Jan 2019

Accepted: 05 Feb 2019

Available online: 18 Feb 2018

Correspondence:

Yılmaz BAŞ

Hitit Üniversitesi

Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Patoloji Kliniği, Çorum,

TÜRKİYE/TURKEY

yilbas@yahoo.com

ÖZET Amaç: İmmünohistokimyasal (İHK) olarak CD10, BCL-6, MUM-1/IRF-4 antikor ekspresyonlarının ve Ki-67 proliferasyon indeks oranlarının germinal merkez (GM) B hücre benzeri ve GM-dışı B hücre benzeri diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL) ayrımında kullanılıp kullanılmayacağına belirlemesidir. **Gereç ve Yöntemler:** 18 Ocak 2008 ile 03 Eylül 2012 tarihleri arasında, Dr. Abdurrahman Yurtarslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümünde, lenf düğümünde DBBHL tanısı konulmuş 66 hasta çalışmaya dâhil edildi. İmmünohistokimyasal (İHK) olarak CD10, BCL-6, MUM-1/IRF-4 antikorlarının ekspresyon oranları ve yaş, cinsiyet, anatomik yerleşim dağılımları, antiapoptotik protein olan BCL-2 ve Ki-67 indeksi yönünden incelendi. **Bulgular:** Erkek hasta sayısı 35 (%53), kadın hasta sayısı 31 ve ortalama yaş 61,3±14,2 (27-88) yıl idi. En sık lokalizasyon servikal bölgeydi. Sırasıyla, CD10, BCL-6, MUM1/IRF4 ve BCL-2, 66 hastanın %18,2, %65,2, %78,8, ve %93,9'unda pozitif iken, %81,8, %34,8, %21,2 ve %6,4 hastada negatif bulundu. Ki-67 proliferasyon indeksi ortalama 76,4±15,8 idi. On yedi (%25,8) hasta GM B hücre benzeri, 49 (%74,2)'u GM-dışı B hücre benzeri DBBHL tanısı aldı. **Sonuç:** GM B hücre benzeri ve GM-dışı B hücre benzeri DBBHL ayrımında kullanılabilir İHK belirteçlerinin CD10 ve MUM1/IRF4 olduğu, BCL-6'nın ise belirleyici etkisinin bulunmadığı sonucuna varılmıştır. Ki-67 proliferasyon indeksinin GM B hücre benzeri ve GM-dışı B hücre benzeri DBBHL ayrımında belirleyici etkisi bulunmamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Diffüz büyük B hücreli lenfoma; immünohistokimya; CD10; BCL-6; MUM-1/IRF-4; Ki-67 indeks

ABSTRACT Objective: We aimed to determine whether CD10, BCL-6, MUM-1/IRF-4 antibody expressions and Ki-67 proliferation index ratios as immunohistochemical (IHC) can be used to differentiate germinal center B cell-like (GCB) and non-germinal center B cell-like (non-GCB) diffuse large B cell lymphoma (DBBHL) in this study. **Material and Methods:** Between 18 January 2008 and 03 September 2012, the study included 66 patients diagnosed with DBBHL in the lymph node of the Department of Pathology, Dr. Abdurrahman Yurtarslan Ankara Onkoloji Training and Research Hospital. Immunohistochemical (IHC) expression of CD10, BCL-6, MUM-1/IRF-4 antibodies and age, sex, distribution of anatomic location, anti-apoptotic protein BCL-2 and Ki-67 index were examined. **Results:** The number of male patients was 35 (53%) and the number of female patients was 31 and the mean age was 61.3±14.2 (27-88). The most common localization was the cervical region. Respectively, CD10, BCL-6, MUM1/IRF4 and BCL-2 were positive in 18.2%, 65.2%, 78.8% and 93.9% of 66 cases, negative in 81.8%, 34.8%, 21.2% and 6.4% of 66 cases. The mean Ki-67 proliferation index was 76.4±15.8. 17 (25.8%) cases were diagnosed as GCB and 49 (%74.2) cases were diagnosed as non-GCB DBBHL. **Conclusion:** It was concluded that IHC markers which can be used in the differentiation of GCB and non-GCB DBBHL are CD10 and MUM1/IRF4, and BCL-6 has no determining effect. The Ki-67 proliferation index has no determining effect on the differentiation of GCB and germinal non-GCB DBBHL.

Keywords: Diffuse large B cell lymphoma; immunohistochemistry; CD10; BCL-6; MUM-1/IRF-4; Ki-67 index

Lenfoma, bölgeden bölgeye dünya çapında farklılık gösteren çeşitli alt tiplere sahip bir hastalıktır. Altta yatan lenfoma gelişimi ile ilgili bazı faktörler tanımlanmış olsa da (viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, immünsüpresif ilaçların kullanımı, diyet, yaşam tarzı ve çeşitli kimyasallara maruz kalma gibi) lenfomaların etiolojisi büyük ölçüde bilinmemektedir ve daha iyi bilgi sahibi olunması umulmaktadır.¹

B hücreli neoplazmlar, çeşitli diferansiyasyon evrelerindeki matür ve immatür B hücrelerin klonal tümörüdür. Normal B hücre diferansiyasyon evrelerini taklit etme eğilimi, bu neoplazmların sınıflandırma ve adlandırılmalarında başlıca temel alınan durumdur.² Matür B hücreli lenfomaların farklı bir grubunun bir üyesi olan diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL), Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da en yaygın non-Hodgkin lenfoma (NHL) tipini temsil etmektedir.³ Batı ülkelerinde erişkin NHL'nin %25-30'unu oluşturmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde yüksek oranda görülmektedir.^{4,5} Görülme yaşı ortalama 70'tir. Ancak çocuklarda ve genç erişkinlerde de görülebilmektedir. Erkeklerde biraz daha sık rastlanmaktadır.⁴

DBBHL, tüm NHL'ler içinde hem en yüksek oranda görülen hem de klinik, morfolojik, immüno-fenotipik ve sitogenetik olarak en heterojenöz olan grubu oluşturmaktadır. Bu heterojenitesinden dolayı DBBHL'ler son derece farklı klinik gidişler göstermektedir.⁴

DBBHL, ilk kez "Revised European-American Lymphoma Study Group" sınıflamasında ayrı bir lenfoma tipi olarak tanımlanmış, en son Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflamasında yine ayrı bir tip olarak ve eklenen alt tipleriyle birlikte yerini almıştır.^{4,6}

DBBHL, önceden mevcut olan düşük dereceli periferik B hücreli bir lenfomadan dönüşüm ile ortaya çıkabileceği gibi, *de novo* olarak da gelişebilmektedir.⁴ Hastaların %20-30'unun foliküler lenfomadan geliştiği düşünülmektedir.⁷ Asya ve Latin Amerika kökenli hastalarda Epstein Barr virüs (EBV) insidansı %9-15'tir.^{8,9}

Tutulumu nodal veya ektranodal olabilmektedir. Yaklaşık %40 hasta ektranodaldır. En sık tutulan ektranodal alan gastrointestinal sistemdir.⁴

Kemik iliği tutulumu hastaların %11-27'sinde bildirilmiştir.⁵ Klinik olarak genellikle bir veya birden fazla nodal veya ektranodal alanda hızlı büyüyen kitle ile kendisini göstermektedir.^{5,10}

Patolojik olarak makroskopide DBBHL, lenf düğümünde homojen balık eti görünümü oluşturmaktadır. Hemoraji ve nekroz görülebilmektedir. Ektranodal tutulumda ise fibrozis gösteren geniş invaziv tümör kitleleri şeklinde izlenmektedir.¹¹ Histomorfolojik olarak normal bir lenfositin iki katından büyük veya normal makrofajın nükleus boyutuna eşit veya daha büyük B lenfoid hücrelerin diffüz proliferasyonu izlenmektedir.⁴ Sentroblastik, immünoblastik ve anaplastik varyantları en yaygın histolojik tipleridir.^{4,12}

Son yıllarda, aynı morfolojik alt tip içinde yer alan hastaların prognostik heterojenitesinin gözlenmesi üzerine, farklı prognoza sahip hastalar arasında fenotipik ve genotipik farklılıklar ortaya konulmaya çalışılmaktadır. Bu açıdan *de novo* DBBHL hastalarının bir kısmında normal germinal merkez (GM) B hücrelerinin gen ekspresyonunun, diğer bir kısmında normal aktive periferik kan B hücrelerinin gen ekspresyonunun bulunduğu, bir üçüncü grupta ise belirgin ekspresyonun bulunmadığı saptanmıştır.⁴ Böylece DBBHL'ler "GM B hücre benzeri" ve "GM dışı B hücre benzeri" olmak üzere iki fenotipik alt gruba ayrılmıştır. GM B hücre benzeri profil gösterenlerin daha iyi prognoza sahip oldukları bilinmektedir.¹³

DBBHL'nin klinikopatolojik heterojenitesi, aslında moleküler patogenezi çeşitliliği yansıtmaktadır. DBBHL'ler germinal hücre bağlantılı B hücrelerinin moleküler ve genotipik özelliklerini göstermektedir. Yarısından fazlasında iki primer moleküler lezyon olan BCL-2 ya da BCL-6 proto-onkogen aktivasyonu görülmektedir. Buna bağlı olarak BCL-6 rearanjmanı (+) DBBHL ve BCL-2 rearanjmanı ve p53 mutasyonları (+) DBBHL olmak üzere iki farklı genotipik subgrup tanımlanmıştır.¹⁴ 2017 DSÖ sınıflandırmasında yer alan nadir görülen IRF4 translokasyonlu büyük B hücreli lenfoma tipi öncelikle çocuklarda ve gençlerde görülmektedir. Erişkinlerde tipik olarak Waldeyer halkasında veya baş ve boyun bölgelerinde gelişmektedirler. Bu vakalarda foliküler veya diffüz

büyük hücre morfolojik yapısı olabilir ve MUM1'i güçlü bir şekilde ifade etmektedir. FISH çalışmaları ile MUM1/IRF4 onkogen translokasyonu tanıyı doğrulamaktadır.¹⁵ DSÖ 2017 sınıflandırmasında yeni önerilerde, DBBHL NOS'ta "double expressor" fenotipinin değerlendirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu, hücrelerin %50'sinden fazlasında BCL2 proteininin ekspresyonunu ve hücrelerin %40'undan fazlasında MYC proteininin ekspresyonu olarak belirtilir. Bu fenotip, diğer özelliklerden bağımsız olarak, bu fenotipe sahip olmayan vakalara kıyasla daha kötü bir prognozla ilişkilidir. Sonuç olarak, DBBHL'nin tüm vakaları, anormallikler için genetik veya FISH çalışmalarından bağımsız olarak, hem MYC hem de BCL-2 immünohistokimyasal (İHK) ekspresyonu açısından değerlendirilmelidir.⁴

Bu çalışmada, finansman eksikliği nedeni ile, MYC ve EBV ekspresyonu, antijen reseptör genler, mutasyon görünümü ve kromozomal translokasyonlar çalışılmamıştır. Bu çalışmada, lenf düğümünde DBBHL tanısı konulmuş 66 hastanın İHK olarak CD10, BCL-6, MUM-1/IRF-4 ve BCL-2 antikorları ile ekspresyon ve bu hastaların yeni tanımlanan subgruplara ayrılarak yaş, cinsiyet, anatomik yerleşim dağılımları, antiapoptotik protein olan BCL-2 proliferatif marker olan Ki-67 yönünden incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

18 Ocak 2008 ile 03 Eylül 2012 tarihleri arasında, Dr. Abdurrahman Yurtarslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümünde daha önce DBBHL tanısı almış 66 hasta retrospektif olarak tekrar incelendi. T.C. Sağlık Bakanlığı Abdurrahman Yurtarslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu onayı (2012-

331) alındı. Bu çalışma Helsinki Deklarasyonu 2008 Prensipleri'ne (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>) uygun olarak yapıldı. Hastaların yaş, cinsiyet ve anatomik lokalizasyonları kaydedildi. Tüm hastaların Hema-toksilen-Eozin (HE) boyalı ve İHK çalışılmış (CD10, BCL-6, MUM1/IRF4, BCL-2, Ki-67) preparatları, DSÖ kriterlerine göre tekrar gözden geçirildi.⁴ İHK yapılmış, ancak değerlendirmeye elverişli olmayan preparatlar yeniden çalışılarak ve eksik olan İHK boyamalar yapılarak hastalara ait preparatlar değerlendirmeye hazır hâle getirildi. İHK inceleme için kullanılacak antikorlar ve klonları **Tablo 1**'de görülmektedir.

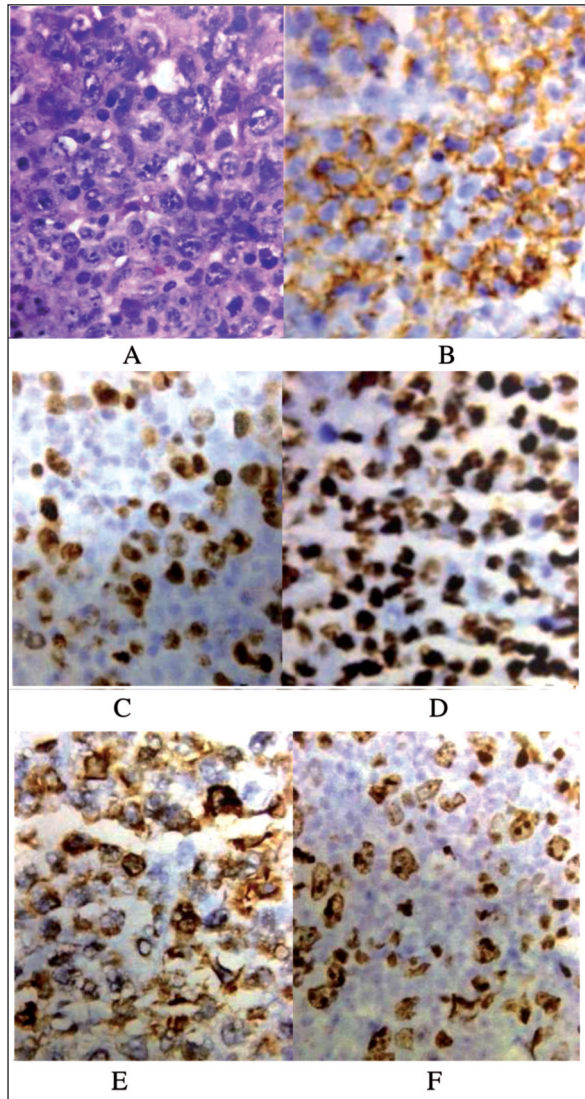
Boyama dereceleri yarı kantitatif bir yöntemle, farklı zamanlarda iki kez değerlendirildi. Pozitif boyanan tümör hücrelerinin tümör dokusuna oranı belirlendi. CD10, BCL-6 ve MUM1/IRF4 çalışmasında, tümör hücrelerinin %30'undan fazlası boyanmış ise pozitif olarak kabul edildi.¹³ Boyanan tümör hücreleri oranı %30'dan az ise negatif kabul edildi. BCL-2 çalışmasında, tümör hücrelerinin %50'sinden fazlası boyanmışsa pozitif olarak kabul edildi.^{16,17} Ki-67 proliferasyon indeksi, 400x büyütmede, tümör hücrelerinin en fazla boyandığı sahada, boyanan tümör hücrelerinin tüm tümör hücrelerinin oranına bakılarak hesaplandı. Ki-67 eşik değeri %70 olarak alındı.^{18,19} BCL-6, MUM1/IRF4, Ki-67 için nükleer boyanma, CD10 ve BCL-2 için sitoplazmik boyanma pozitif kabul edildi (**Resim 1**).

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde SPSS 20.0 paket programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistiksel metotların (ortalama, standart sapma) yanı sıra ikili grupların karşılaştırılmasında bağımsız t testi, nitel

TABLO 1: Çalışmada immünohistokimyasal boyamalar için kullanılan antikorlar.

Antikor	Klon	Firma	Antijen retrieval	Dilüsyon
CD10	56C6	Neomarkers	EDTA, 44 dk, 95°C	1/40
BCL-6	PG-B6p	Dako	EDTA, 60 dk, 95°C	1/20
MUM/IRF4	MUM-1p	Dako	EDTA, 36 dk, 95°C	1/50
BCL-2	100/D5	Neomarkers	EDTA, 40 dk, 95°C	1/100
Ki-67	SP6	Biocare	Sitrat, 32 dk, 95°C	1/100



RESİM 1: A) DBBHL (HE, 40x); B) İmmünohistokimyasal CD10 pozitif tümör hücreleri (40x); C) MUM1 pozitif tümör hücreleri (40x); D) BCL-6 pozitif tümör hücreleri (40x); E) BCL-2 pozitif tümör hücreleri (40x), F) Yüksek Ki-67 proliferasyon indeksi (40x).

verilerin karşılaştırılmasında ki-kare testi ve Fisher's exact testi kullanıldı. Sonuçlar anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan toplam 66 hastanın 35 (%53)'i erkek, 31 (%47)'i kadın idi. Ortalama yaş $61,3 \pm 14,2$ (27-88) yıl bulundu. 66 hastanın 25 (%37,9)'i 60 yaşından küçük, 41 (%62,1)'i ise 60 yaşından büyüktü. Hastaların ikisinde daha önceden kronik lenfositik lösemi tanısı mevcuttu. Bu hasta Richter's sendromu olarak değerlendirildi.

CD10, 66 hastanın 12 (%18,2)'sinde pozitif iken, 54 (%81,8)'ünde negatif idi.

BCL-6, 66 hastanın 43 (%65,2)'ünde pozitif iken, 23 (%34,8)'ünde negatif idi.

MUM1/IRF4, 66 hastanın 52 (%78,8)'sinde pozitif iken, 14 (%21,2)'ünde negatif idi.

BCL-2, 66 hastanın 62 (%93,9)'sinde pozitif iken, 4 (%6,1)'ünde negatif idi.

Ki-67 proliferasyon indeksi ortalama $76,4 \pm 15,8$ idi.

Altmış altı hastanın 17 (%25,8)'si GM B hücre benzeri, 49 (%74,2)'u GM-dışı B hücre benzeri DBBHL tanısı aldı. GM B hücre benzeri hastalarda yaş ortalaması $63,7 \pm 13,6$ yıl iken, GM-dışı B hücre benzeri DBBHL hastalarında ortalama $54,4 \pm 14,0$ yıl idi (Şekil 1).

Yaş 60 eşik değerine göre gruplara ayrıldığında subgruplara göre hastaların dağılımı şöyledi: Yaşı 60'ın altında olan 25 (%37,9) hastanın 15 (%30,6)'inin GM-dışı B hücre benzeri, 10 (%58,8)'unun GM B hücre benzeri DBBHL grubunda olduğu gözlemlendi. Yaşı 60 ve üstünde olan 41 (%62,1) hastanın 34 (%69,4)'ünün GM-dışı B hücre benzeri, 7 (%41,2)'sinin GM B hücre benzeri DBBHL grubunda olduğu gözlemlendi. İstatistiksel olarak, 60 eşik değeri ile iki gruba ayrılan yaş ile DBBHL subgrupları arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (Odds oranı=3.23, %95 güven aralığı=1,02-10,10 $p < 0,05$).

Kırk dokuz GM-dışı B hücre benzeri DBBHL hastasının 23 (%46,9)'ü kadın, 26 (%53,1)'i erkek idi. On yedi GM B hücre benzeri DBBHL hastasının 8 (%47,1)'i kadın, 9 (%52,9)'u erkek idi. Cinsiyet ile DBBHL subgrupları arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p > 0,05$).

Hem GM B hücre benzeri hem de GM-dışı B hücre benzeri DBBHL hastalarında en sık lokalizasyon servikal bölge idi. Anatomik dağılım ile DBBHL subgrupları arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p > 0,05$) (Tablo 2).

GM-dışı B hücre benzeri DBBHL hastalarının tümünde ($n=49$) CD10 negatif bulundu. CD10, 17 GM B hücre benzeri DBBHL hastasının 5 (%29,4)'inde negatif iken, 12 (%70,6)'sinde pozitif

idi. İstatistiksel olarak CD10 pozitifliği ile GM B hücre benzeri DBBHL arasında anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.001$) (Tablo 3).

BCL-6, 49 GM dışı B hücre benzeri DBBHL hastasının 20 (%40,8)'inde negatif, 29 (%59,2)'unda pozitif iken, 17 GM B hücre benzeri DBBHL olgusunun 3 (%17,6)'ünde negatif, 14 (%82,4)'ünde pozitif saptandı. İstatistiksel olarak BCL-6 ile DBBHL subgrupları arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

CD10 negatif Bcl-6 pozitif 29 GM-dışı B hücre benzeri DBBHL hastasının tümünde (%100,0) MUM1/IRF4 pozitif idi. CD10 negatif Bcl-6 pozitif 5 GM B hücre benzeri DBBHL hastasının tümünde (%100,0) MUM1/IRF4 negatif bulundu. CD10 negatif Bcl-6 pozitif DBBHL subgrupları ile MUM1/IRF4 arasında anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0,001$) (Tablo 4).

MUM1/IRF4, 49 GM-dışı B hücre benzeri DBBHL hastasının 2 (%4,0)'inde negatif, 47 (%96,0)'inde pozitif iken, 17 GM B hücre benzeri DBBHL hastasının 12 (%70,6)'inde negatif, 5 (%29,4)'inde pozitif idi. İstatistiksel olarak MUM1/IRF4 ile DBBHL subgrupları arasında anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0,001$) (Tablo 5).

TABLO 2: DBBHL subgruplarının anatomik lokalizasyonları ve oranları.

Anatomik lokalizasyon	GM	GM-dışı	Toplam
	B hücre benzeri DBBHL	B hücre benzeri DBBHL	
	n=17 (%)	n=49 (%)	n=66 (%)
Servikal bölge	8 (47,1)	19 (38,8)	27 (40,9)
Aksiller bölge	6 (35,3)	9 (18,4)	15 (22,7)
İnguinal bölge	2 (11,8)	10 (20,4)	12 (18,2)
Supraklaviküler bölge	1 (5,9)	2 (4,1)	3 (4,5)
Dalak hilusu	0 (0)	2 (4,1)	2 (3,0)
Peripankreatik bölge	0 (0)	1 (2,0)	1 (1,5)
İnce bağırsak mezosu	0 (0)	1 (2,0)	1 (1,5)
Mide küçük kurvatur	0 (0)	1 (2,0)	1 (1,5)
Sağ jugulodigastrik bölge	0 (0)	1 (2,0)	1 (1,5)
Sağ jugular bölge	0 (0)	1 (2,0)	1 (1,5)
İliyak arter çevresi	0 (0)	1 (2,0)	1 (1,5)
Submandibular bölge	0 (0)	1 (2,0)	1 (1,5)

GM: Germinal merkez; DBBHL: Diffüz büyük B hücreli lenfoma.

TABLO 3: DBBHL subgrupları ile CD10 arasındaki pozitif-negatif değerler.

CD10	GM dışı B hücre benzeri DBBHL	GM B hücre benzeri DBBHL	Toplam
	(n/%)	(n/%)	
Negatif	49 (100,0)	5 (29,4)	54 (81,8)
Pozitif	0 (0,0)	12 (70,6)	12 (18,2)
Toplam	49 (100,0)	17 (100,0)	66 (100,0)

Pearson Ki-Kare: Değer 42,275^a, Asymp. Sig. (2 taraflı) 0,000.

^a1 hücrede (%25,0) 5'ten daha az sayı bekleniyor. Beklenen minimum sayı 3,09.

Fisher's Exact Testi: Exact Sig. (2 taraflı) 0,000

Geçerli olgular, n=66.

GM: Germinal merkez; DBBHL: Diffüz büyük B hücreli lenfoma.

TABLO 4: DBBHL subgrupları ile MUM1/IRF4 arasındaki pozitif-negatif değerler.

MUM1/IRF4	GM dışı B hücre benzeri DBBHL	GM B hücre benzeri DBBHL	Toplam
	(n/%)	(n/%)	
Negatif	2 (4,1)	12 (70,6)	14 (21,2)
Pozitif	47 (95,9)	5 (29,4)	52 (78,8)
Toplam	49 (100,0)	17 (85,2)	66 (100,0)

Pearson Ki-Kare: Değer 29,867^a, Asymp. Sig. (2 taraflı) 0,000.

^a1 hücrede (% 25,0) 5'ten daha az sayı bekleniyor. Beklenen minimum sayı 3,86.

Fisher's Exact Testi: Exact Sig. (2 taraflı) 0,000

Geçerli olgular, n=66.

GM: Germinal merkez; DBBHL: Diffüz büyük B hücreli lenfoma.

TABLO 5: C10 negatif Bcl-6 pozitif DBBHL subgrupları ile MUM1/IRF4 arasındaki pozitif-negatif değerler.

CD10 negatif Bcl-6 pozitif DBBHL	GM dışı B hücre benzeri DBBHL	GM B hücre benzeri DBBHL	Toplam
	(n/%)	(n/%)	
MUM1/IRF4 Negatif	0 (0,0)	5 (100,0)	5 (14,8)
MUM1/IRF4 Pozitif	29 (100,0)	0 (0,0)	29 (85,2)
Toplam	29 (100,0)	5 (100,0)	34 (100,0)

Pearson Ki-Kare: Değer 27,356^a, Asymp. Sig. (2 taraflı) 0,000.

^a1 hücrede (% 25,0) 5'ten daha az sayı bekleniyor. Beklenen minimum sayı 1,85.

Fisher's Exact Testi: Exact Sig. (2 taraflı) 0,000

Geçerli olgular, n=34.

GM: Germinal merkez; DBBHL: Diffüz büyük B hücreli lenfoma.

BCL-2, 49 GM-dışı B hücre benzeri DBBHL hastasının 3 (%6,1)'ünde negatif, 46 (%93,9)'sında pozitif iken, 17 GM B hücre benzeri DBBHL olgusunun 1 (%5,9)'inde negatif, 16 (%94,1)'sında pozitif idi. İstatistiksel olarak BCL-2 ile DBBHL subgrupları arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Ki-67 proliferasyon indeksi %70 eşik değer alındığında, istatistiksel olarak Ki-67 proliferasyon indeksi ile CD10, BCL-6 ve MUM1/IRF4 arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$, $p>0,05$ ve $p>0,05$).

TARTIŞMA

DBBHL'nin hem patolojik hem de klinik özelliklerin bir kombinasyonuna dayanan birçok varyant ve alt tip bulunmaktadır. Bu heterojen gruptaki çeşitli antiteler arasında farklılaşma, klinik bulgular, morfoloji, immünofenotipik ve moleküler/genetik çalışmaların bir kombinasyonunu gerektirmektedir. DSÖ Sınıflamasının 2008 baskısından 2017 yılına revize edilmesi, günümüze kadarki histoloji, immünofenotip ve moleküler bulgular temelinde sınıflandırmayı getirmiştir. DBBHL klinik, morfolojik ve sitogenetik açıdan oldukça heterojen bir grubu temsil etmektedir. Hastaların geniş bir kısmı (%40) kemoterapiye son derece duyarlı olup, uzun dönem hastalısız yaşam gösterirken, bir grubunda prognoz oldukça kötü seyretmektedir.⁴

Hans, Naz, Muris, Colomo ve ark.nın çalışmalarında, sırasıyla, 82 (%53,9), 27 (%64), 45 (%63,3) ve 59 (%46,1) erkek ve 70 (%46,1), 15 (%38), 28 (%43,7) ve 69 (%53,9) kadın saptanmıştır.^{13,19-21} Ortalama yaş, sırasıyla, 63 (14-90), 44 (13-80), 62 (23-82) ve 65 (22-93) olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda erkek hasta sayısı 35 (%53), kadın hasta sayısı 31 idi ve ortalama yaş da diğer çalışmalara benzer oranda $61,3\pm 14,2$ (27-88) yıl olarak belirlendi.

Naz ve ark.nın 20 nodal DBBHL hastasını ele aldıkları çalışmalarında, GM-dışı B hücre benzeri DBBHL hastalarının en sık servikal lenf düğümünde, GM B hücre benzeri DBBHL hastalarının en sık inguinal lenf düğümünde ortaya çıktığı gözlemlenmiş, fakat bu bulguların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirtilmiştir.¹⁹ Çalışmamızda her iki grupta en sık lokalizasyon servikal bölge olarak saptanmıştır.

İlk kez Alizadeh ve ark., daha sonra Wright ve ark.nın yaptığı çalışmalarda, cDNA moleküler yöntemleri ile gen ekspresyon profillerine dayanarak DBBHL'lerin iki alt gruba ayrılabilceği ve bu iki grubun prognostik olarak birbirinden farklılık gös-

terdiği belirtilmiştir.^{22,23} Ancak, günlük rutin uygulamada cDNA moleküler yöntemlerin oldukça pahalı olması ve taze dokudan yapılması nedeni ile gen ekspresyon profil çalışmaları yapmak çok da olası değildir. İşte bu noktadan yola çıkarak, Hans ve ark.nın yayımladıkları 152 hastadan oluşan bir seride, GM B hücre benzeri DBBHL tipini GM-dışı B hücre benzeri DBBHL tipinden ayırmak için kullanılabilcek İHK belirteçler ve bu belirteçlere bağlı olarak geliştirilen (Şekil 1) bir algoritma oluşturulmuştur.¹³ GM hücre belirteçleri olarak BCL-6 ve CD10, GM-dışı hücre belirteçleri olarak da MUM1/IRF4 kullanılmıştır. CD10 tek başına pozitif veya CD10 ve BCL-6 pozitif ise veya CD10 ve BCL-6 negatif ise GM B hücre benzeri DBBHL olarak gruplandırılmıştır. CD10 negatif ve BCL-6 pozitifliği durumunda MUM1/IRF4 ekspresyonuna bakılmış ve pozitif ise GM-dışı B hücre benzeri DBBHL, negatif ise GM-B hücre benzeri DBBHL olarak gruplandırılmıştır.^{4,13} Çalışmalarında, 152 hastanın 42 (%28)'si CD10 pozitif, 85 (%56)'i BCL-6 pozitif; 151 hastanın 71 (%47)'inde MUM1/IRF4 pozitif bulmuşlardır.¹³ Bu bulgulara göre 152 hastanın 64 (%42)'ü GM B hücre benzeri DBBHL, 88 (%58)'i GM-dışı B hücre benzeri DBBHL olarak gruplandırılmıştır.¹³ Bu günümüze kadarki en bilinen pratik bir sınıflandırma yöntemidir. Hans ve ark.nın sınıflandırması, duyarlılık ve özgüllük konusunda bazı sınırlamalara sahiptir ve vakaların %20'sine kadar yanlış sonuç verebilmektedir.¹³ Nebraska Üniversitesi tarafından geliştirilmesinin ardından, aynı grup tarafından geliştirilmiş bir duyarlılık ve özgüllüğe sahip yeni bir sınıflandırma önerilmiştir. DSÖ 2017 tarafından önerilen, her iki yöntemin de kullanılabilceği yönündedir.²⁴

Berglund ve ark.nın çalışmasında, 161 hastanın 56 (%35)'sında CD10 pozitif, 78 (%48)'inde BCL-6 pozitif ve 51 (%32)'inde MUM1/IRF4 pozitif saptanmıştır.²⁵ Seksen iki (%51) hasta GM B hücre benzeri DBBHL, 79 (%49)'u GM-dışı B hücre benzeri DBBHL olarak gruplandırılmıştır. Imhoff ve ark., 66 DBBHL hastanın 38 (%57,6)'inde GM B hücre benzeri, 28 (%42,4)'inde GM-dışı B hücre benzeri DBBHL belirlemişlerdir.²⁶ Naz ve ark.nın çalışmalarında, 15 (%36) hastada GM B hücre benzeri, 27

(%64)'sinde GM-dışı B hücre benzeri DBBHL saptanmıştır.¹⁹ Çalışmamızda CD10, 17 GM B hücre benzeri DBBHL hastasının 5 (%29,4)'inde negatif iken, 12 (%70,6)'sinde pozitif bulunmuştur. CD10 negatif BCL-6 pozitif 29 GM-dışı B hücre benzeri DBBHL hastasının tümünde (%100) MUM1/IRF4 pozitif idi. CD10 negatif BCL-6 pozitif 5 GM B hücre benzeri DBBHL hastalarının hepsinde (%100) MUM1/IRF4 negatif saptanmıştır. Sonuçta, CD10 pozitifliği ve MUM1/IRF4 negatifliği ile GM B hücre benzeri DBBHL arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p<0.001$). Veelken ve ark. ile Poulsen ve ark.nın yaptıkları çalışmada, subgruplar arasında prognostik olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.^{27,28}

CD10 membran metalloproteinazdır. Normal sentrifoliküler B hücreleri (GM B hücreleri) için oldukça spesifik bir belirteçtir. DBBHL'de ekspresyon oranı çeşitli serilere göre %20-40 arasında değişmektedir.²⁹ CD10 ekspresyonunda çoğunlukla kabul gören ve çalışmamızda da dikkate alınan eşik değer, Hans ve ark. tarafından belirlenmiş olan %30'dur.¹³ Çalışmamızda, CD10 ekspresyonu GM-dışı B hücre benzeri DBBHL hastalarının hiçbirinde gözlenmezken, GM B hücre benzeri DBBHL hastalarının %70,6'sında pozitif olarak bulunmuştur. Literatür çalışmalarına benzer olarak, çalışmamızda, CD10'un Gm B hücre benzeri DBBHL ve GM-dışı B hücre benzeri DBBHL ayırımında kullanılabileceği görülmüştür ($p<0,05$).

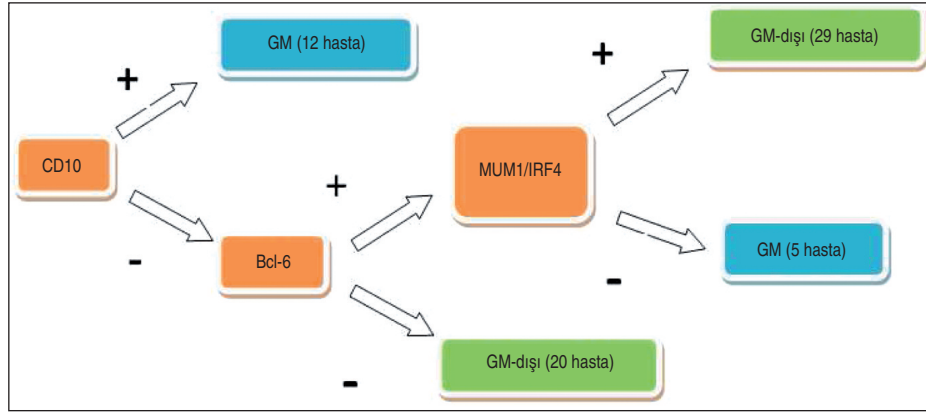
BCL-6 normal lenfoid dokularda, GM B hücrelerince eksprese edilen bir transkripsiyonel regülatör proteindir. DBBHL'de BCL-6 ekspresyonu değişik kaynaklarda %30-95 arasında değişmektedir.^{13,20,21,25} BCL-6 ekspresyonunda çoğunlukla kabul gören ve bu çalışmada da dikkate alınan eşik değer, Hans ve ark. tarafından belirlenen %30'dur.¹³ Çalışmamızda, BCL-6 GM-dışı B hücre benzeri DBBHL hastalarının %59,2'sinde pozitif iken, GM B hücre benzeri DBBHL hastalarının %82,4'ünde pozitif olarak saptanmıştır. Literatürdeki çoğu çalışmaya benzer olarak, bu çalışmada da BCL-6'nın GM B hücre benzeri DBBHL ve GM-dışı B hücre benzeri DBBHL ayırımında belirleyici etkisinin olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

BCL-2 antiapoptotik bir proteindir ve programlı hücre ölüm düzenlenmesinden sorumlu büyük bir protein ailesine üyedir. BCL-2 ekspresyonunun artması malign B hücrelerine yaşama avantajı sağlamakta ve kemoterapiye dirençte önemli rol oynamaktadır.³⁰ DBBHL'de %24-79 oranında eksprese olmaktadır.^{16,30} Çalışmamızda, BCL-2 GM dışı B hücre benzeri DBBHL hastalarının %93,9'unda, GM B hücre benzeri DBBHL hastalarının %94,1'inde pozitif olarak değerlendirilmiştir. Böylece BCL-2'nin GM B hücre benzeri ve GM-dışı B hücre benzeri DBBHL ayırımında kullanılabilecek İHK belirteci olmadığı anlaşılmıştır ($p>0,05$).

MPM-2 ailesine ait olan Ki-67, proliferen hücrelerde eksprese olan nükleer bir proteindir. G1 fazından mitoz fazına kadar olan dönemlerde nükleusta eksprese olmakta, mitoz sonrası Ki-67 antijen seviyesi minimal düzeye düşmektedir.²⁸ DBBHL'de Ki-67 proliferasyon indeksi son derece değişkendir. Hastaların büyük kısmında %40'ın üzerindedir. Colomo ve ark.nın çalışmalarında, CD10 pozitif GM B hücre benzeri DBBHL hastalarında, CD10 negatif GM B hücre benzeri ve GM-dışı B hücre benzeri DBBHL hastalarındakine göre belirgin olarak daha düşük olduğu saptanmıştır.²¹ Çalışmamızda, Ki-67 proliferasyon indeksi GM B hücre benzeri DBBHL hastalarında ortalama $71,1\pm 17,6$ iken, GM-dışı B hücre benzeri DBBHL hastalarında $78,2\pm 14,8$ olarak saptanmıştır. %70 eşik değere göre Ki-67 proliferatif indeksi ile DBBHL subgrupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

SONUÇ

Çalışmamızda, lenf düğümünde DBBHL tanısı konulmuş 60 hastada, CD10, Bcl-6 ve MUM1/IRF4 antikorları ile ekspresyon durumu incelenerek hastalar GM B hücre benzeri ve GM-dışı B hücre benzeri subgruplara ayrılmıştır. Bu subgruplar ile yaş, cinsiyet ve anatomik yerleşim gibi bazı klinik parametreler ve Bcl-2 ve Ki-67 indeksi arasındaki ilişki incelenmiştir. Yaş ve anatomik dağılım ile DBBHL subgrupları arasında istatistiksel olarak ilişki olmadığı saptanmıştır. Yine CD10 pozitifliği ile GM B hücre benzeri DBBHL arasında, yine MUM1/IRF4 ile DBBHL subgrupları arasında an-



ŞEKİL 1: 66 DBBHL olgusunda immünohistokimyasal subgrupların pozitif ve negatif sonuçlarına göre dağılımı.

GM: Germinal merkez; DBBHL: Diffüz büyük B hücreli lenfoma.

lamlı bir ilişki bulunmuştur. GM B hücre benzeri ve GM-dışı B hücre benzeri DBBHL ayırımında kullanılabilir İHK belirteçlerinin CD10 ve MUM1/IRF4 olduğu, BCL-6 ve BCL2'nin ise tek başına belirleyici etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Ki-67 proliferasyon indeksinin GM B hücre benzeri ve GM-dışı B hücre benzeri DBBHL ayırımında belirleyici etkisi olmadığı görülmüştür.

DBBHL'de tedaviyi yönlendirmek ve sonuçları daha iyi tahmin etmek için moleküler/genetik, immünofenotipik ve klinik kriterler ile İHK ve morfolojik tanıyı desteklemek gerekmektedir.

Teşekkür

Dr. Abdurrahman Yurtarslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümünde görev almış olan sayın hocamız Dr. Işın Pak'a katkıları için teşekkür ederiz.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet,

gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Tuğba Özçerezci; **Tasarım:** Yılmaz Baş; **Denetleme/Danışmanlık:** Tuğba Özçerezci, Yılmaz Baş; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Tuğba Özçerezci; **Analiz ve/veya Yorum:** Tuğba Özçerezci, Yılmaz Baş; **Kaynak Taraması:** Tuğba Özçerezci, Yılmaz Baş; **Makalenin Yazımı:** Tuğba Özçerezci, Yılmaz Baş; **Eleştirel İnceleme:** Tuğba Özçerezci, Yılmaz Baş; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Tuğba Özçerezci, Yılmaz Baş; **Malzemeler:** Tuğba Özçerezci.

KAYNAKLAR

- Saçlam A, Esin E, Hayran M, Boyraz B, Üner A. Distribution of lymphomas in Turkey: data of 4239 cases from a single institution using the WHO classification. *Turk J Med Sci.* 2018;48(5):1013-23. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Jaffe S, Harris NL, Stein H, Campo E, Pileri SA, Swerdlow SH. Introduction and overview of the classification of the lymphoid neoplasms. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Thiele J, et al, eds. *Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue.* 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2008. p.158-66.
- Al-Hamadani M, Habermann TM, Cerhan JR, MAcon WR, Maurer MJ, Go RS. Non-Hodgkin lymphoma subtype distribution, geodemographic patterns, and survival in the US: a longitudinal analysis of the National Cancer Data Base from 1998 to 2011. *Am J Hematol.* 2015;90(9):790-5. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- World Health Organization (WHO). Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. *Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* 4th ed. Lyon: IARC; 2017. p.291-4.
- Ioachim HL, Medeiros LJ. Diffuse follicle center cell lymphoma. *Ioachim's Lymph Node Pathology.* 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. p.423-31.
- de Leval L, Harris NL. Variability in immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its clinical relevance. *Histopathology.* 2003;43(6):509-28. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Warnke RA, Weiss LM, Chan J, Cleary M, Dorfman R. *Atlas of Tumor Pathology, Tumors of the Lymph Nodes and Spleen.* Washington, DC: AFIP; 1995. p.153-221.
- Morales D, Beltran B, De Mendoza FH, Riva L, Yabar A, Quiñones P, et al. Epstein-Barr virus as a prognostic factor in de novo nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia Lymphoma.* 2010;51(1):66-72. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Park S, Lee J, Ko YH, Han A, Jun HJ, Lee SC, et al. The impact of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2007;110(3):972-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Simon R, Durrleman S, Hoppe RT, Bonadonna G, Bloomfield CD, Rudders RA, et al. The Non-Hodgkin Lymphoma Pathologic Classification Project. Long-term follow-up of 1153 patients with non-Hodgkin lymphomas. *Ann Intern Med.* 1988;109(12):939-45. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Borowitz MJ, Chan JKC. B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities. Jaffe ES, Harris NL, Vardiman JW, eds. *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2001. p.171-4.
- Chan JCK. Tumors of the Lymphoreticular system. In: Fletcher CDM, ed. *Diagnostic Histopathology of Tumors.* Vol II. 3rd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2007. p.1198-206.
- Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood.* 2004;103(1):275-82. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Rossi D, Gaidano G. Molecular heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma: implications for disease management and prognosis. *Hematology.* 2002;7(4):239-52. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Salaverria I, Philipp C, Oschlies I, Kohler CW, Kreuz M, Szczepanowski M, et al. Translocations activating IRF4 identify a subtype of germinal center-derived B-cell lymphoma affecting predominantly children and young adults. *Blood.* 2011;118(1):139-47. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Barrans SL, Carter I, Owen RG, Davies FE, Patmore RD, Haynes AP, et al. Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2002;99(4):1136-43. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Markovic O, Marisavljevic D, Cemerikic V, Perunicic M, Savic S, Filipovic B, et al. Clinical and prognostic significance of apoptotic profile in patients with newly diagnosed nodal diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Eur J Haematol.* 2011;86(3):246-55. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Broyde A, Boycov O, Strenov Y, Okon E, Shpilberg O, Bairey O. Role and prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol.* 2009;84(6):338-43. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Naz E, Mirza T, Danish F. Clinicopathologic evaluation of subgroups of diffuse large B cell lymphoma by immunohistochemistry. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12(12):3335-9.
- Muris JJ, Meijer CJ, Vos W, van Krieken JH, Jiwa NM, Ossenkuppele GJ, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol.* 2006;208(5):714-23. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Colomo L, López-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martínez A, Bosch F, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2003;101(1):78-84. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature.* 2000;403(6769):503-11. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(17):9991-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Grimm KE, O'Malley DP. Aggressive B cell lymphomas in the 2017 revised WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. *Ann Diagn Pathol.* 2018;38:6-10. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Berglund M, Thunberg U, Amini RM, Book M, Roos G, Erlanson M, et al. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. *Mod Pathol.* 2005;18(8):1113-20. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- van Imhoff GW, Boerma EJ, van der Holt B, Schuurink E, Verdonck LF, Kluijn-Nelemans HC, et al. Prognostic impact of germinal center-associated proteins and chromosomal breakpoints in poor-risk diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(25):4135-42. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Veelken H, Vik Dannheim S, Schulte Moenting J, Martens UM, Finke J, Schmitt-Graeff A. Immunophenotype as prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma in patients undergoing clinical risk-adapted therapy. *Ann Oncol.* 2007;18(5):931-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Poulsen CB, Borup R, Nielsen FC, Borregaard N, Hansen M, Grønbaek K, et al. Microarray-based classification of diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol.* 2005;74(6):453-65. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Fabiani B, Delmer A, Lepage E, Guettier C, Petrella T, Brière J, Penny AMet al; Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. CD10 expression in diffuse large B-cell lymphomas does not influence survival. *Virchows Arch.* 2004;445(6):545-51. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A, et al. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(6):961-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]