

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EPSTEİN BARR VİRÜS POZİTİF VE NEGATİF  
PEDIATRİK HODGKİN VE NONHODGKİN  
LENFOMALARDA HÜCRE PROLİFERASYONU  
VE APOPTOZ İLİŞKİLİ FAKTÖRLERİN  
PROGNOZ İLE İLİŞKİSİ**

SAFİYE AKTAŞ

TEMEL ONKOLOJİ  
DOKTORA TEZİ

İZMİR-2006

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EPSTEİN BARR VİRÜS POZİTİF VE NEGATİF  
PEDIATRİK HODGKİN VE NONHODGKİN  
LENFOMALARDA HÜCRE PROLİFERASYONU  
VE APOPTOZ İLİŞKİLİ FAKTÖRLERİN  
PROGNOZ İLE İLİŞKİSİ**

TEMEL ONKOLOJİ  
DOKTORA TEZİ

SAFİYE AKTAŞ

Danışman Öğretim Üyeleri:

Prof.Dr. Nur Olgun,

Prof.Dr. Aydanur Kargı

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 04.KB.SAĞ.080 ve 05.KB.SAĞ.053 sayıları ile desteklenmiştir.

T.C. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Doktora Programında Safiye Aktaş tarafından teslim edilen;

“Epstein Barr Virüs Pozitif ve Negatif Pediatrik Hodgkin Ve Nonhodgkin Lenfomalarda Hücre Proliferasyonu ve Apoptoz İlişkili Faktörlerin Prognoz ile İlişkisi” isimli tez 19.12.2006 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

BAŞKAN

Prof. Dr. Nur OLGUN

ÜYE

Prof. Dr. Aydanur KARGI

ÜYE

Prof. Dr. Gülersu İLKEN

ÜYE

Prof. Dr. Nazan ÇETİNGÜL

ÜYE

Doç. Dr. Mehmet Ali ÖZCAN

## **TEŞEKKÜR**

**Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Doktora Programı içerisinde tez çalışmamın planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesi aşamalarında ilgi, destek ve bilimsel katkılarından dolayı, Sayın Prof. Dr. Nur Olgun'a, Prof. Dr. Aydanur Kargı'ya; Dr Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji ve Onkoloji çalışanlarına, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü çalışanlarına teşekkür ederim.**

**Dr. Safiye Aktaş**

**İzmir, Aralık 2006**

## İÇİNDEKİLER

1. TABLO-ŞEKİL-RESİM ve KISALTMA DİZİNİ .....	iii
1.1. Tablo Dizini.....	iii
1.2. Şekil ve Resim Dizini.....	iii
1.3. Kısaltma Dizini.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
2. ÖZET .....	1
3. YABANCI DİLDE ÖZET .....	3
4. GİRİŞ VE AMAÇ .....	5
5. GENEL BİLGİLER .....	6
5.1. Hodgkin Lenfoma .....	6
5.1.1. Nodüler Lenfosit Baskın HL .....	7
5.1.2. Klasik HL .....	7
5.1.2.1 Nodüler Sklerozan Klasik HL .....	7
5.1.2.2. Mikst Sellüler Klasik HL .....	7
5.1.2.3. Lenfosit Zengin Klasik HL.....	7
5.1.2.4. Lenfosit Fakir Klasik HL.....	7
5.2. NonHodgkin Lenfoma .....	7
5.2.1. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma .....	9
5.2.2. Burkitt Lenfoma/ Burkitt Benzeri Lenfoma .....	9
5.2.3. Prekürsör T Ve B Hücreli Lenfoblastik Lenfoma/Lösemi .....	10
5.2.4 Anaplastik Büyük Hücreli Lenfoma .....	11
5.3. Epstein-Barr Virüs ve Karsinogenez .....	12
5.4. Proliferasyon .....	13
5.4.1. C-myc protein ekspresyonu .....	14
5.5. Apoptoz ve Apoptoz İlişkili Faktörler .....	14
5.5.1. Apoptoz ve Karsinogenez .....	14
5.5.2. Apoptoz Değerlendirme Yöntemleri .....	15
5.5.3. Bcl-2 .....	15
5.5.4. Bax .....	16
5.5.5. P53.....	16
5.5.6. Fas .....	16

5.5.7 Survivin .....	17
6. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	18
6.1. Olgular ve Doku Örnekleri .....	18
6.2. Parafine Gömülü Arşiv Dokusunda Floresan İn Situ Hibridizasyon .....	18
6.2.1. Genel İlke.....	18
6.2.2 Uygulama basamakları .....	18
6.3. İmmünohistokimya .....	20
6.3.1. Genel İlke.....	20
6.3.2 Uygulama basamakları .....	20
6.4. TUNEL Boyaması .....	21
6.4.1. Genel İlke.....	21
6.4.2 Uygulama basamakları .....	21
6.5. Değerlendirme .....	23
6.6. Kullanılan Solüsyonlar, Kimyasal Maddeler, Gereçler .....	23
6.6.1. Kullanılan Solüsyonlar .....	23
6.6.2. Kimyasal Maddeler .....	24
6.6.3. Gereçler .....	26
6.7. İstatistik Yöntem .....	26
7. BULGULAR .....	27
7.1. Olgulara Genel Bakış .....	27
7.1.1. Hodgkin Lenfoma Olgulara Genel Bakış .....	27
7.1.2. NonHodgkin Lenfoma Olgulara Genel Bakış .....	27
7.2. İmmünohistokimya Floresan İn Situ Hibridizasyon, ve TUNEL Bulguları ...	27
7.2.1. Hodgkin Lenfoma .....	27
7.2.2. NonHodgkin Lenfoma .....	28
7.3. İstatistik Bulgular .....	28
7.3.1. Hodgkin Lenfoma: İstatistik Bulgular .....	28
7.3.2. NonHodgkin Lenfoma: İstatistik Bulgular .....	28
8. TARTIŞMA .....	45
9. SONUÇ .....	52
10. KAYNAKLAR .....	54
11. ETİK KURUL RAPORU.....	65

## **1. TABLO, ŞEKİL, RESİM ve KISALTMA DİZİNİ**

### **1.1.Tablo Dizini**

1. Hodgkin Lenfoma Sınıflaması (WHO Histolojik Sınıflama, REAL )
2. WHO Hematopoetik ve Lenfoid Dokuların Noeplastik Hastalıkları Sınıflaması Uyumlu Pediatrik nonHodgkin Lenfoma Sınıflaması
3. Hodgkin Lenfoma Olgularının Genel Özellikleri
4. NonHodgkin Lenfoma Olgularının Genel Özellikleri
5. Hodgkin Lenfomada Apoptoz İlişkili Faktörlerin EBV İle İlişkisi
6. Non-Hodgkin Lenfomada Apoptoz ilişkili faktörlerin EBV ile ilişkisi

### **1.2. 1. Şekil Dizini**

1. Hodgkin Lenfoma Olgularının EBV ve histolojik tiplere göre dağılımı.
2. HL olgularında Ki-67 indeksinin EBV'e göre Karşılaştırılması
3. HL olgularında Aİ'in EBV'e göre karşılaştırılması
4. HL olgularında c-myc Ekspresyonunun EBV'e Göre Karşılaştırılması
5. HL Olgularında Survivin Ekspresyonunun Histolojik Tiplere Göre Karşılaştırılması
6. NonHodgkin Lenfoma Olgularının EBV ve Histolojik Tiplere Göre Dağılımı
7. NHL'da Ki 67 indeksinin Histolojik tip ve EBV'ye göre Dağılımı
8. NHL'da Apoptoz İndeksinin EBV'ye Göre Dağılımı
9. NHL'da fas Ekspresyonunun EBV'ye göre Dağılımı
10. NHL'da Fas ekspresyonunun Histolojik Tiplere göre Dağılımı
- 11: NHL'da Bcl-2 Ekspresyonunun EBV'ye göre Dağılımı
12. NHL'da c-myc Ekspresyonunun Histolojik Tiplere Göre Dağılımı
13. HL Olgularında EBV'in Olaysız Sağkalım ile İlişkisi
14. HL Olgularında C-myc'in Olaysız Sağkalım ile İlişkisi
15. HL Olgularında Bcl-2'in Olaysız Sağkalım ile İlişkisi
16. NHL'da EBV'nin Sağkalıma Etkisi
17. NHL'da Bcl-2 Ekspresyonunun Sağkalıma Etkisi
18. NHL'da c-myc Ekspresyonunun Sağkalıma Etkisi

### **1.2.2 Resim Dizini**

1. Hodgkin Lenfoma
2. NonHodgkin Lenfoma
3. Hodgkin Lenfomada Reed Sternberg Hücrelerinde İmmunhistokimyasal Boyanma

4. NonHodgkin Lenfomada İmmunhistokimyasal Boyanma
5. Floresan İn Situ Hibridizasyon İle EBER Pozitifliği.
6. TUNEL yönteminde Apoptotik Hücreler.

#### **1.4. Kısaltma Dizini**

- AI: Apoptoz İndeksi  
ABHL: Anaplastik Büyük Hücreli Lenfoma  
DAB: Diamino Benzidin  
BuBuBL: Burkitt/ Burkitt Benzeri Lenfoma  
DBBHL: Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma  
dH2O: Distile su  
EBER: EBV-encoded small nonpolyadenylated RNAs  
EBNA: EBV-determined nuclear antigens  
EBV: Epstein-Barr Virüs  
FISH: Floresan İn Situ Hibridizasyon  
HL: Hodgkin Lenfoma  
HRS: Hodgkin ve Reed-Sternberg Hücreleri  
İHK: İmmunhistokimya  
LFHL: Lenfositlen Fakir Hodgkin Lenfoma  
LBL: Lenfoblastik Lenfoma  
LMP: Latent Membran Proteinler  
LZHL: Lenfositlen Zengin Hodgkin Lenfoma  
MSHL: Mikst Sellüler Hodgkin Lenfoma  
NSHL: Nodüler Sklerozan Hodgkin Lenfoma  
NHL: Non-Hodgkin Lenfoma  
PBS: Fosfat Tampon Çözeltilisi  
PTHL: Periferal T Hücreli Lenfoma  
PI: Proliferasyon İndeksi  
TUNEL: "TdT-mediated dUTP-FITC nick end-labeling"



## **2. ÖZET**

### **EPSTEİN BARR VİRÜS POZİTİF VE NEGATİF PEDIATRİK HODGKİN VE NONHODGKİN LENFOMALARDA HÜCRE PROLİFERASYONU VE APOPTOZ İLİŞKİLİ FAKTÖRLERİN PROGNOZ İLE İLİŞKİSİ**

**Safiye Aktaş**

**Dr Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi**

**Yazışma Adresi:**

**1420 sokak no:67/1 35230 Alsancak İzmir**

Pediyatrik HL ve NHL patogeneğinde apoptoz, proliferasyon, EBV ilişkisi güncel araştırılmaktadır. Antiapoptotik Bcl-2, proapoptotik bax, apoptoz inhibitör protein survivin, ekstremek apoptoz yolağı reseptörü fas, tümör süpresör p53 apoptoz ilişkili faktörlerdir. C-myc hücre siklusunun G1-S faz geçişinde etkin bir onkogen, ki-67 G1-S-G2-M fazlarında eksprese olan proliferasyon belirleyicisidir. Bu çalışmanın amacı pediyatrik HL ve NHL'da EBV, proliferasyon, apoptoz ve ilişkili faktörlerin patogeneğ ve prognozadaki rolünü araştırmaktır.

EBV-EBER, LMP-1, ki-67, bcl-2, bax, survivin, p53, c-myc, fas, in-situ TUNEL yöntemi ile apoptotik indeks(Aİ) 63 HL, 70 NHL'da araştırılmıştır. Bulgularla klinik veriler Ki-kare, Mann Whitney U, Pearson korelasyon, Kaplan Meier sağkalım analizleriyle istatistiksel değerlendirilmiştir.

HL olgularının yaş ortalaması 8.46'dır. Otuziki erken, 31 geç evre olguda dört exitus, altı rekürrens saptanmıştır. Genel sağkalım %94, olaysız sağkalım %83.6' dır. EBV %82.5, bax %74.6, bcl-2 %47.6, survivin %43, p53 %33.3, fas %54 ve c-myc %25.4 pozitifdir. Aİ ortalama %18,22, proliferasyon indeksi %57,83'dür. EBV ile proliferasyon indeksi pozitif, Aİ ters ilişkili; bax, bcl-2, survivin, p53, fas, c-myc ilişkisiz bulunmuştur. Tüm parametreler sağkalım ilişkisizdir.

NHL olgularının yaş ortalaması 7.16'dır. Erken evre yedi, ileri evre 63 olgunun, onunda exitus, dördünde rekürrens vardır. Genel sağkalım %82, olaysız sağkalım %75'tir. EBV %25.7, bax %40, bcl-2 %50, survivin %42,9, p53 %8,6, fas %18,6, c-myc %45,7 pozitifdir. Aİ ortalama 131,29/5000 hücre, PI %55,97'dir. EBV fasla ilişkili, bcl-2 ile ters ilişkilidir.

Diğer faktörlerle ilişkisizdir. Hiçbir faktör sağkalım belirleyicisi değildir.

Sonuçlarımız EBV'nin pediatrik HL patogenezinde proliferatif aktiviteyi tetikleyip apoptozu önleyerek rol oynayabileceği desteklemektedir, ancak prognoz belirleyici değildir. Pediatrik NHL serimizde bulgular EBV'nin patogeneizde öncelikli etkili olmadığını desteklemektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Pediatrik, Hodgkin Lenfoma, NonHodgkin Lenfoma, EBV, Apoptoz, Proliferasyon, Prognoz

### **3. YABANCI DİLDE ÖZET-SUMMARY**

#### **PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF CELL PROLIFERATION AND APOPTOSIS-REGULATING PROTEINS IN EPSTEIN-BARR VIRUS POSITIVE AND NEGATIVE PEDIATRIC HODGKIN AND NON-HODGKIN'S LYMPHOMA**

**Safiye Aktaş**

**Dr Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi**

**Corresponding Adress:**

**1420 sokak no:67/1 35230 Alsancak İzmir TURKEY**

Apoptosis, proliferation and relationship with EBV is a contemporary issue in the pathogenesis of HL and NHL. Antiapoptotic bcl-2, proapoptotic bax, inhibitor of apoptosis protein survivin, extrinsic apoptotic pathway receptor fas, tumor suppressor gene product p53 are apoptosis-related proteins. C-myc is an oncogene that plays a role in cell-cycle G1-S pass. Ki 67 is a proliferation marker expressed in G1, S, G2, M phases of cell-cycle. In this study prognostic or pathogenetic role of EBV, proliferating activity, apoptosis and regulating proteins in pediatric HL and NHL were explored.

EBV-EBER, Imp-1, ki-67, Bcl-2, survivin, Bax, fas, c-myc, p53 and AI detected by in-situ TUNEL method were explored in 63 HL and 70 NHL cases. Statistical evaluation was done by chi-square, Mann Whitney U test, Pearson Correlation Analysis and Kaplan Meier survival analysis.

The mean age of HL cases was 8.46. Among 32 early stage and 31 advanced stage cases exitus was observed in four cases and relapse in six cases. Overall survival was 94% and event free survival 83.6%. EBV was positive in 82.5%, bax in 74.6%, bcl-2 in 47.6%, survivin in 43%, p53 in 33.3%, fas in 54% and c-myc in 25.4% cases. Mean AI was 18,22%. Mean proliferation index (PI) was 57,83%. EBV was positively related with PI while negatively related with AI, not related with bax, bcl-2, survivin, p53, fas and c-myc. None of the parameters were related with prognosis.

The mean age of NHL cases was 7.16. Among seven early stage and 63 advanced stage cases exitus was observed in 10 cases and relapse in four cases. Overall survival was 82%, while event free survival was 75%. EBV was positive in 25.7%, bax in 40%, bcl-2 in 50%,

survivin in 42,9%, p53 in 8,6%, fas in 18,6% ve c-myc 45,7%. Mean AI was 131,29/5000 cells, mean PI was 55,97%. EBV was related with fas and negatively related with bcl-2, not related by other factors. None of the parameters were related with prognosis.

Our results suggest that EBV might play a role in HL pathogenesis by inducing proliferative activity and by inhibiting apoptosis but does not predict prognosis. Our results of pediatric NHL series indicate that EBV does not have a primary role in the pathogenesis.

**Keywords:** Pediatrics, Hodgkin's Lymphoma, NonHodgkin's Lymphoma, EBV, Apoptosis, Proliferation, Prognosis

#### **4. GİRİŞ VE AMAC**

Hodgkin Lenfoma (HL) ve Non-Hodgkin Lenfoma (NHL) klinik olarak agresif seyirli ama tedavi ile sağkalım oranları yüksek heterojen ve farklı hastalık guruplarıdır (1). Etiyopatogenezlerinin açıklanmasında önemli gelişmeler olmasına karşın belirsizlikler sürmektedir. Epstein-Barr Virüs (EBV)-tümör ilişkisi üzerinde güncel çalışma sürdürülen bir konudur (1-7). EBV- HL ilişkisi bilinen bir konu olmasına karşın EBV'nün hastalığın gelişimindeki rolü ve prognostik önemi tartışmalıdır.

Otuz yıl öncelere dayanan bir bilgi birikimi olan EBV-tümör ilişkisi son yıllarda tekrar yoğun olarak çalışılmaya başlanmıştır (8-11). EBV lenfoma ilişkisi bölgesel ve ülkesel düzeyde ayrı ayrı çalışılmaktadır. Çünkü hastalığın endemik, nonendemik ve immünyetmezlik ilişkili olup olmadığının saptanmasında önemlidir (12-18). Ülkemizde bu konuda yurtiçi, ya da yurtdışı bağlantılı az sayıda serolojik, immunhistokimya (IHK), Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) ya da PCR bazlı çalışmalar vardır (19-26). Bu çalışmalarda EBV ilişkisi HL'da % 43-55 oranında bildirilmektedir (27, 28).

C-myc hücrelerin G1 fazından S fazına geçişinde rol oynayan onkogendir. Artışı tumor gelişimi ile ilişkilidir. Birçok tümör gurubunda yaygın çalışılmıştır (29-31). Ki-67 hücre siklusunun G1, S, G2, M fazlarında eksprese olan proliferasyon ilişkili proteine karşı geliştirilmiş monoklonal antikordur. Lenfoma ya da diğer tümörlerde doku örneklerinde büyüme fraksiyonunun değerlendirilmesinde İHKsal yöntemle uygulanır (32).

P53 hücre siklus düzenlenimi, DNA onarımı ve apoptozda rolü olan bir nükleer proteindir (33-39). Bcl-2 ailesine ait bcl-2 antiapoptotik (40-46), Bax ise proapoptotik proteinlerdir (47). CD95(fas) apoptozu uyaran hücre membran proteindir (48-54). EBV pozitif hücre hatlarında artmış fas ekspresyonunun LMP-1 ile düzenlendiği bildirilmektedir. CD95 aracılı apoptoz bcl-2 protoonkogeninin ekspresyonu ile en azından parsiyel olarak inhibe olur. CD95 reseptörü ve ligandı ilaç uyarımlı apoptozda yer almaktadır. Survivin apoptoz inhibitörü ve hücre bölünme düzenleyicisidir. Apoptozu kaspaz-9 üzerinden bloke ettiği düşünülür (55-69).

Bu çalışmanın amacı pediatrik HL ve NHL olgularında EBV varlığını, proliferasyon aktivitesi, c-myc protein ekspresyonu, apoptoz ve bcl-2, bax, survivin, p53, fas gibi apoptoz ilişkili faktörlerin prognostik önemini ve EBV ile ilişkisini araştırmaktır.

## **5. GENEL BİLGİLER**

### **5.1. Hodgkin Lenfoma**

HL klinik olarak agresif ama tedavi ile sağ kalım oranları yüksek; malign lenfoma gurubunda kabul edilen heterojen bir hastalıktır (1). Hodgkin ve Reed-Sternberg Hücrelerinin (HRS) orijininin lenfoid kökenli olduğunun saptanmasıyla eskiden Hodgkin Hastalığı olarak adlandırma yerini HL'ya bırakmıştır. Genellikle lenf düğümlerinde gelişirler. En sık servikal bölge tutulumu olur. Çoğunluğu genç erişkinlerde gözlenmektedir. Etiyopatogenezinin açıklanmasında önemli gelişmeler olmasına karşın belirsizlikler sürmektedir. Enfeksiyon ile ilişkisine yönelik epidemiyolojik, klinik, ve histopatolojik kesin bulgular vardır. On dört yaş altı, 15-34 yaş ve 55-74 yaş olarak 3 epidemiyolojik formu olsa da gelişmekte olan ülkelerde çocuklarda daha fazladır. Bu epidemiyolojik özelliklerden EBV'e maruz kalma yaşı sorumlu olabilir. EBV-Tümör ilişkisi üzerinde güncel çalışma sürdürülen bir konudur (1-7). HL'nın Lukes-Butler Şemasına dayanan modern sınıflaması tablo 1'de verilmiştir (70). Biyolojik ve klinik özellikleri ile iki farklı hastalık grubuna ayrılmıştır. Klinik özellikleri, davranışları, morfolojileri, neoplastik hücrelerin, immunfenotip ve immunglobulin ekspresyonları ve zemindeki hücrelerin kompozisyonları farklıdır. Klasik HL alt tiplerinde ise immunfenotipler ve genetik özellikler aynıdır ancak tutulum yeri, büyüme özellikleri, klinik özellikler, fibrosis varlığı, zemindeki hücre kompozisyonu, HRS hücrelerinin sayısı ve atipisi farklılıklar göstermektedir. HL olguları için modifiye Ann Arbor evreleme sistemi (Cotswold revizyonu) kullanılır. EBV- HL ilişkisi bilinen bir konu olmasına karşın EBV'nün hastalığın gelişimindeki rolü ve prognostik önemi tartışmalıdır (71-76).

Tablo 1: Hodgkin Lenfoma Sınıflaması (WHO Histolojik Sınıflama, REAL )

- 
1. Nodüler Lenfosit Baskın HL
  2. Klasik HL
    - a. Nodüler Sklerozan Klasik HL
    - b. Mikst Sellüler Klasik HL
    - c. Lenfosit Zengin Klasik HL
    - d. Lenfosit Fakir Klasik HL
-

**5.1.1. Nodüler Lenfosit Baskın HL:** Neoplastik hücreler LH (lenfositik/histiositik) ya da popcorn hücreleri olarak adlandırılan B lenfosit kökenli hücrelerdir. . Klasik HRS hücreleri yoktur ya da çok azdır. Diffüz alanlar içeren ya da içermeyen formu olabilir. Neoplastik hücreler J zincir, CD20, CD79a pozitif olup CD30, CD15 negatif ekspresyon gösterir (71).

**5.1.2. Klasik HL:** Neoplastik hücreler CD30 pozitif olup, J zincir negatiftir. CD15, CD20, CD79a pozitif ya da negatif olabilirler. Bu hücrelerin de B lenfosit kökenli oldukları kabul edilmektedir.

**5.1.2.1. Nodüler Sklerozan Klasik HL (NSHL):** Laküner hücreler ve kollajenize bantlarla karakterizedir. Bu bantlar birefrenjant olup genellikle kalın bir lenf düğümü kapsülünden çıkarlar. Laküner HRS hücreleri bantların oluşturduğu nodüllerin merkezinde daha fazla olma eğilimindedirler. Eozinofil ve nötrofil sıktır. Buna karşın histiosit ve plazma hücreleri azdır.

**5.1.2.2. Mikst Sellüler Klasik H L (MSHL):** Lenfositten zengin ve fakir tip arasında bir kategoridir. HRS hücreleri kolaylıkla saptanır. Lenf düğümü kapsülü genellikle sağlamdır ve normal kalınlıktadır. Lenfosit, eozinofil, histiosit ve plazma hücreleri HRS hücreleri ile heterojen bir karışım göstermektedir. Nodülarite izlenimi verebilir ancak fibröz bant yoktur. Bir çok çalışma da mikst sellüler olgularda nodüler sklerozan olgulara göre daha fazla EBV ilişkisi saptanmıştır (2).

**5.1.2.3. Lenfositten Zengin Klasik HL (LZHL):** MSHL'ya benzer ancak HRS hücreleri azdır. Zeminde küçük lenfositler fazladır, diğer inflamatuvar hücreler yok ya da çok azdır.

**5.1.2.4. Lenfositten Fakir Klasik HL (LFHL):** Diffüz fibrosis ve retiküler olmak üzere iki varyantı vardır. Hücreleri tek tek saran retikülin fibrosis vardır. HRS hücreleri sayıca fazla olup kolay saptanır. Özellikle retiküler varyanta HRS hücreleri pleomorfik olup kümeler oluşturabilir.

## **5.2. NonHodgkin Lenfoma**

Lenfomalar lenfositik seri hücrelerinin malign proliferasyonu sonucu oluşur. Çocukluk çağında agresif lenfomalar gözlenir. NHL'ların yalnızca %3'ünü oluşturan pediatrik NHL'lar erkeklerde daha sık görülmektedir. NHL çocukluk çağı kanserlerinin %6-7 sini oluşturur. (77). Folliküler lenfoma gibi erişkinde sık görülen düşük dereceli lenfomalar pediatrik yaş gurubunda yok denecek kadar azdır. Pediatrik NHL'ların yaklaşık yarısını Burkitt/ Burkitt

Benzeri Lenfoma (BuBuBL), üçte birini Lenfoblastik Lenfoma (LBL) ve kalanını Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DBBHL) ve Anaplastik Büyük Hücreli Lenfoma (ABHL) oluşturur (70, 78, 79). Bunlar tedavisiz bırakıldığında yaşam süresi aylar-haftalar ile sınırlı lenfomalar grubundandır. Erkek/kız oranı 2.5:1 olup tüm yaşlarda görülebilir ancak 15-19 yaşta DBBHL artışı nedeniyle pik yapar (80). Pediatrik NHL'lar lokalizasyona göre klinik bulgu verir. %35 abdominal (ileoçekal, apendiks, çıkan kolon), %26 mediastinal (superior vena cava sendromu, efüzyon, kardiak tamponad), %13 baş boyun bölgesinde (servikal lenf düğümleri, parotis bezi, çene, tek tonsil hipertrofisi) lokalize olup, %11 diğer bölgeler (deri, deri altı, orbita, tiroid, kemik böbrek, epidural boşluk, meme, gonad), %14 periferik lenf düğümleri tutulur. İnvaginasyon abdominal lokalizasyonun tipik kliniğidir. Mediastinal lenfomaların kemik iliği tutma ve ALL dönüşme eğilimleri vardır (81). Erişkinlere göre çocukluk çağında kemik iliği tutulumu daha sıktır.

Var olan kanıtlar lenfomaların proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptozu etkileyen genetik değişiklikler temelinde ortaya çıktığını desteklemektedir. NHL'ların her histolojik alt tiplerine spesifik translokasyonlar sözkonusudur (79). NHL'da yardımcı olabilecek in situ hibridizasyonla saptanabilen sitogenetik anormallikler vardır. t(8;14) (q24,1;q32,3) myc geninin IgH ağır zincir bölgesine translokasyonu ile myc aşırı ekspresyonu ve proliferasyon artışı oluşur. Burkitt Lenfomada görülür. t(3;14) (q27; 32,3) Bcl-6 geninin IgH ağır zincir bölgesine translokasyonu ile Bcl-6 aşırı ekspresyonu oluşur. DBBHL görülür. t(2;5) (p23;q35) ile ALK (Tirozin Kinaz) NPM (Nükleofosmin) füzyon proteini oluşur. ABHL'da görülür (81).

Tedavi gruplarını kategorize etmek için evreleme, kemik iliği tutulumu, santral sinir sistemi tutulumu belirlenir. Protokole göre tedavinin yönlendirilmesinde prekürsör veya matür ayrımı ve T veya B ayrımı ile CD30 pozitif büyük hücreli lenfoma (anaplastik) olup olmadığı önemlidir. DBBHL ayrımı ile Burkitt benzeri lenfoma ayrımında bazen zorluklar olsa da klinik ve morfoloji ile bazen de yardımcı ek İHK'sal boyamalar (c-myc, bcl-2, Ki67 gibi) ile ayırıcı tanıya gidilebilmektedir (82). Tanı; evreleme ve ilk tedaviye yanıtın değerlendirilmesi; tedavide kemoterapi çeşitliliği, süresi, kranial ışınlama, intratekal kemoterapi uygulaması, ALL yüksek riski için tedaviye geçiş, kemik iliği nakil kararı gibi değişikliklere yön verir (70).



### **5.2.1. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DBBHL)**

Erişkinlerde lenfomaların %30'unu, çocuklarda lenfomaların %20'sini oluşturur. E/K oranı birbirine yakındır. Nodal, ektranodal olabilir. %50 olgu evre III/IV olarak başvrur. Primer olabilir ya da küçük lenfositik lenfoma/kronik lenfositik lösemi, lenfoplazmasitik lenfoma, marjinal zon lenfoma, Folliküler lenfoma, Klasik HL, Nodüler lenfosit baskın tip HL' dan transformasyonla sekonder olarak gelişebilir. Çocuklarda genelde primerdir. Büyük transforme lenfoid hücrelerden oluşur. Hücreler normal bir histiyositten daha büyüktür. Nükleusları, normal makrofaj nükleusundan ya da normal lenfositin iki katından büyük neoplastik lenfoid hücrelerin diffüz proliferasyonudur (82). Nükleus konturları değişkenlik gösterir. Bu gurup lenfomalar mikroarray teknolojiler ile aktive B hücre benzeri ve germinal merkez B hücre benzeri alt tiplere ayrılmıştır. Aktive B hücre benzeri tipi CD5 pozitif iken germinal merkez B hücre benzeri tipi CD5 negatif CD10 pozitifdir. Ancak yapılan çalışmalarda çocukluk çağında DBBHL' ların germinal merkez B hücre benzeri tipinde olduğunu göstermiştir. Bu durumun çocuklarda daha iyi prognozu açıklayabileceği vurgulanmaktadır. Morfolojik varyantları arasında sentroblastik, monomorfik, polimorfik , immünoblastik, T-hücre/histiyosit zengin ve anaplastik yer almaktadır. B hücre belirleyicilerini eksprese ederler (CD19, CD20, CD22, CD79α), (70). Ig %50-75, CD10 %25-50, bcl-2 %30-50, bcl-6 %55-97, CD5 %5-10 oranında pozitifdir. Ki-67 ile saptanan Pİ'i %40'ın üzerindedir. Burkitt benzeri lenfomalarla ayırımında zorluk yaşanabilir. Bcl-2 pozitifliği varsa DBBHL lehine değerlidir. Ki67 ile %100' e yakın saptanan Pİ'i BuBuBL lehinedir. Ancak DBBHL çok yüksek Pİ olabileceği unutulmamalıdır. Kemik iliği tutulumu olguların %16'sında görülür. Ig ağır zincir geni sıklıkla mutasyona uğramıştır. Genetik olarak bcl-2 gen ekspresyonunda artış(+18q21,ilave bcl-2 gen kopyası), %20-30 olgu t(14;18) , %20 olguda TP53 de mutasyon ya da delesyon, nadiren t(8;14) gözlenir.

### **5.2.2. Burkitt / Burkitt Benzeri Lenfoma (BuBuBL)**

Sıklıkla ekstra nodal bölgelerde bulunan ya da akut lösemi olarak başlayan agresif bir neoplazidir. Germinal merkez B hücrelerinden köken almaktadır. Endemik, sporadik ve immünyetmezlik ilişkili olmak üzere 3 klinik formu vardır. Çocukluk çağı lenfomalarının %50'sini oluşturur. Erkek/ dişi oranı 2-3/1' dir (83). Endemik formunda çene ve fasial kemik tutulumu tipiktir. Sporadik formunda sıklıkla abdominal tutulum olur. Ektranodal ya da nodal olabilir. En sık ileoçekal bölgede görülür. Hem endemik hem sporadik forma over,

böbrek, meme gibi organların eşlik etmesi sıktır. İmmünyetmezlik ilişkili formunda nodal ve kemik iliği tutulumu sıktır. Waldeyer halkası ve mediastinal tutulum seyrektr. Etiyolojide EBV, HIV, Malarya gibi uzun süreli B hücre aktivasyonu sorumlu tutulmaktadır (84). EBV ilişkisi endemik formda %100, sporadik formda %30 altı, immünyetmezlik ilişkili formda %%25-40 dır. EBV enfekte B hücrelerin T hücreler tarafından defektif regülasyonu sonucu lenfoma geliştiği görüşü hakimdir. Kromozom 8q24 de bulunan *myc* genini içeren translokasyonlar patogeneizde rol oynar. Ancak *myc* translokasyonu Burkitt lenfomaya özgü değildir. Hücre siklüsuna girişte ve apoptoza dahil olan genlerin aktivasyonunda rol oynar. Morfolojik varyantları, klasik, Plasmasitoid differansiye ve atipik Burkitt/Burkitt benzeridir. Monomorfik orta büyüklükte B hücrelerden oluşur. Multipl nükleollü olan bu hücreler bazofilik seçilebilen sitoplazmalıdır. Sık mitoz içerir. Klasik Burkitt lenfoma en sık görülür ve bazofilik çok sayıda nükleol içeren orta büyüklükte hücrelerden oluşur. Sitoplazma bazofilik olup genellikle lipid vakuoller içerir. Apoptotik tümör hücrelerini sindirmiş çok sayıda benign makrofajlar eşlik eder, yıldızlı gök manzarası oluşturur. Ancak yıldızlı gök manzarası BL özgü değildir. Atipik Burkitt/Burkitt-benzeri varyantta yine yıldızlı gök manzarası vardır ancak iri hücrelerle karışık klasik Burkitt lenfomada tanımlanan hücreler gözlenir. Genetik olarak %80 olguda t(8;14), %10 olguda t(8;22), %5 olguda t(2;8) gözlenir. Agresif olmasına karşın tedavi edilebilir bir tümördür. Tedavi olabildiğince erken başlamalıdır. % 70'i evre III/IV olarak karşımıza çıkar. Kür düşük evrede %90, yüksek evrede %60-80 olup çocuklarda daha iyidir. Relaps olursa ilk yılda görülür. İlk iki yılda relaps olmayan olgular tedavi edilmiş kabul edilebilir (85). Proliferasyon indeksi %100'e yakındır. Burkitt lenfoma CD19+, CD20+, CD22+, CD10+, bcl-6+, yüzey İgM +, bcl-2-, TdT-, Ki-67>%95 şeklinde immunfenotip gösterir (86-89).

### **5.2.3. Prekürsör T Ve B Hücreli Lenfoblastik Lenfoma/Lösemi (LBL, ALL)**

Lenfoblastlardan kaynaklanan neoplazilerdir. ALL ve LBL benzer klinik, patolojik, immünolojik, sitogenetik, moleküler özellikler içerirler ve aynı antitenin lösemi ve lenfoma prezentasyonları olarak kabul edilirler (86). ALL-LBL ayırımında LBL'da kemik iliğinde lenfoblast populasyonunun %25'in altında olması önemlidir. ALL; %80-85 B hücreli, %15-20 T hücrelidir. LBL; %90 T hücreli, %10 B hücrelidir. B-ALL %75 oranında altı yaş altında gözlenir. T-ALL -adelosanolarda ve erkeklerde daha sıktır (87). B-LBL %75 oranında 18 yaş altında gözlenir. T-LBL adolosan erkeklerde sıktır. LBL olgularının %89'u evre III/IV

olarak karşımıza çıkar. Kemik iliği tutulumu %50 olguda gözlenir. Morfolojik olarak küçük, dar sitoplazmalı, kaba kromatinli, belirsiz nükleollü olabileceği gibi ince kromatinli, seçilebilen bazofilik sitoplazmalı belli belirsiz veya belirgin nükleollü olabilir (71). Ezilme artefaktı sıktır. Mitoz sıktır. Lenf düğümünde parsiyel tutulumda özellikle parakortikal alanın işgali, korunmuş germinal merkezler vasküler yapılar çevresinde yoğunlaşma, damar duvarlarının infiltrasyonu, lümende lenfoblastlar kollojen lifler arasında tek hücre dizileri şeklinde infiltrasyonu gözlenebilir. Kaynaklandıkları B ve T lenfoblastların matürasyon çizgisindeki farklılaşma aşamalarına göre marker eksprese ederler. T-LBL sitoplazmik CD3, nükleer TdT pozitifliği gösterir. B-LBL TdT, CD19, CD79a, CD10 (çoğunlukla) pozitifdir. CD 20 %50 olguda gözlenir, %75 olguda CD34 pozitifdir (88). Lösemileri değerlendirmede akım sitometri yöntemi kullanılmalıdır. Solid dokulardan da lenfoma ön tanısında RPMI besiyeri içinde hücre süspansiyonu elde edilip akım sitometri çalışılabilir. Parafin dokuda çalışmayan belirleyiciler için yarar sağlar. Ayırıcı tanısına çocuklarda Burkitt lenfoma (TdT -), Büyük hücreli lenfoma (TdT -) (90), Ewing sarkomu/PNET (CD99+), rabdomyosarkom (desmin+) yer alır. Lenfoblastik bir lezyon tanımlandıktan sonra B ve T ALL/LBL birbirlerinden ayrılmalıdır. Aynı morfolojik özelliklere sahip olduklarından ayırım immünofenotipik olarak yapılır.

#### **5.2.4. Anaplastik Büyük Hücreli Lenfoma (ABHL)**

Bir T hücreli lenfomadır. En sık ilk üç dekatta görülür. Bunlar ALK pozitif olanlardır ve erkek cins yatkınlığı vardır. Büyük abondan sitoplazmalı, pleomorfik genellikle at nalı şekilli nükleuslu hücrelerden oluşur. Hücreler CD30 pozitifdir. Çoğunluğunda “anaplastic large cell lymphoma kinase” (ALK) protein pozitifdir. Çoğu olgu sitotoksik granül ilişkili protein eksprese eder. Klasik Hodgkin lenfoma ile ayırımında morfolojik örtüşme nedeniyle sorun oluşabilir. Bu nedenle ABHL sınıflamasında önceleri Hodgkin benzeri alt tip tanımlaması kullanılmıştır. ABHL tanısı için morfolojiye ek olarak tümöral hücrelerin CD30 yanısıra mutlaka ALK pozitif olma koşulu da aranmaktadır. EMA pozitif ekspresyon gözlenir. Hodgkin lenfomada Reed Sternberg hücresi ve varyantları genelde CD3, CD20, LCA negatif olurlar. İHK ile çoğu olguda ayırıcı tanıya gidilebilmektedir (71,86).

Periferel T Hücreli Lenfoma çocuklarda nadirdir, ileri evre ile, sistemik bulgularla, hemofagositik sendromla birlikte klinik görünüm sergiler. Agresif klinik gidişli ve kötü prognozlidir. Erişkin lenfomaların %30 unu oluşturan folliküler lenfoma çocukluk çağında

son derece nadirdir. İyi prognozludur. Sıklıkla servikal lenf düğümünde gözlenir. Çocuklarda erişkinlerin aksine bcl-2 ekspresyonu ve t(14; 18) translokasyonu yoktur. Mukoza ilişkili marginal zon B lenfoma, NK-hücreli lenfoma da gözlenebilir.

Tablo 2. WHO Hematopoetik ve Lenfoid Dokuların Neoplastik Hastalıkları Sınıflaması Uyumlu Pediatrik NonHodgkin Lenfoma Sınıflaması

---

Prekürsör
Lenfoblastik Lösemi/ Lenfoma
Prekürsör T-hücreli
Prekürsör B-hücreli
Matür (periferal)
Matür B-hücreli
Burkitt/ Burkitt benzeri
Diffüz Büyük B Hücreli
Matür T-hücreli
Anaplastik Büyük Hücreli Lenfoma
Periferal T-hücreli Lenfoma
Nadir görülenler

---

### 5.3. Epstein-Barr Virüs ve Karsinogenez

EBV insan herpes virusudur . Enfeksiyöz mononükleoza yol açar. Bazı nasofarinks karsinomlarında, Burkitt lenfomada ve immün baskılanma varlığında gözlenen lenfoproliferatif hastalıklarda etiolojik rol oynadığı düşünülmektedir (1-6). PTHL, oral “hairy leukoplakia”, natural killer hücreli büyük lenfositik lösemi, anjiosentrik lenfoma ve yaklaşık %50 HL’da EBV saptanmıştır (7). Bunlar, EBV’nin B hücrelerini transforme etme yeteneği farklı A ve B olmak üzere iki alt tipi vardır. Bunlar, EBV nükleer antijenlerindeki DNA sekans farkıyla ayrılırlar. Tip B daha zayıf transformerdir. AIDS ilişkili lenfomaların %50’sinde ve Burkitt lenfomaların çoğunda saptanır (8-10). Tip A batı tipi Hodgkin lenfomada ve Asya tipi NonHodgkin lenfomada ve nazofarinks karsinomunda baskındır (91).

DNA hibridizasyon çalışmaları ile lenfoproliferatif hastalığı olan olguların doku biopsilerinde EBV’nin latent (sirküler, episomal) ve replikatif (lineer) formları saptanabilir. Replikatif EBV asiklovir sağaltımına yanıt verir, latent EBV vermez. Arşiv dokularda ve periferik kan mononükleer hücrelerde PCR ile EBV genomu saptanabilir (92).

Parafin bloklardan İHK’sal yöntemle EBV, BZLF1 proteini bakılması virüs partikülü

üreten ya da üretmeye başlayan hücreleri gösterir. Çünkü bu ürün BZLF-1 geninin kodladığı orta-erken transkripsiyon aktivatörü ile reaksiyon veren bir proteindir. Primer B lenfositler EBV ile enfekte olduktan sonra EBNA ortaya çıkar. Önce EBNA-2 ortaya çıkar. Bu spesifik viral ve hücresel genlerin transkripsiyon aktivatörüdür. Sonra EBNA-leader protein ve diğer EBNA' lar eksprese olur. Bunları LMP ve EBER izler. EBV ilişkisini saptama da altın standart olarak İHK'sal LMP-1 ve FISH ile EBV- EBER bakılması önerilmektedir.

Enfeksiyöz ilişkisine yönelik epidemiyolojik, klinik, ve histopatolojik kesin bulgular vardır. 14 yaş altı, 15-34 yaş ve 55-74 yaş olarak 3 epidemiyolojik formu olsa da gelişmekte olan ülkelerde çocuklarda daha fazladır. Bu epidemiyolojik özelliklerden EBV maruz kalma yaşı sorumlu olabilir. EBV tümör ilişkisi üzerinde güncel çalışma sürdürülen bir konudur (1-7).

Gelişen immunoterapi çalışmaları ile etkeni ortadan kaldırıp rekürrens ya da sekonder tümörleri önleme olasılığı vardır (7). Transplantasyonlu, HIV'lı, immünsüprese olgularda lenfoproliferatif hastalıkların ortaya çıkması bu konu üzerine dikkatleri çekmiştir (8-11).

#### **5.4. Proliferasyon**

Proliferasyonu saptamak için otoradyografi, akım sitometri, transferrin reseptör araştırılması, eskitilmiş timidin yerleştirme, bromodeoksiüridin yerleştirme gibi yöntemler geçmişte kullanılmıştır (32). Ancak bu teknikler patoloji pratiğinde çok kullanılamamıştır. Otoradyografinin çok zaman alması, antitransferrin reseptör antikorumun yeterli doğru sonuç vermemesi bazı nedenler arasındadır. G<sub>0</sub> hariç tüm hücre döngüsü fazlarında yer alan Ki-67 nükleus kökenli bir antijeni tanıyarak hücre proliferasyonunu ölçmede kullanılır.

Ki-67 hücre siklusunun G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M fazlarında eksprese olan proliferasyon belirleyicisidir. Lenfoma ya da diğer tümörlerde doku örneklerinde büyüme fraksiyonunun değerlendirilmesinde kullanılan İHK'sal bir monoklonal antikordur. Hücre proliferasyonunu ölçmede kullanılan diğer konvansiyonel yöntemlerle korelasyon göstermektedir (93). Ki-67'nin meme, akciğer, serviks, beyin gibi dokuların tümörlerinde hücre proliferasyonunu saptamada değeri bilinmektedir. Kim ve arkadaşları Ki-67 ekspresyonunu klasik HL' da %86.7 gözlemişler; ancak EBV ve p53, ve p16, retinoblastoma gibi çalıştıkları diğer tümör süpresör proteinlerle aralarında ilişki saptanmamıştır (42).

Birçok tümör grubunda olduğu gibi NHL' da yaygın çalışılmıştır. NHL'da yüksek proliferasyon oranı olan olguların düşük proliferasyon oranı olanlara göre daha kötü prognozlu olduğu gösterilmiştir. Rutin pratikte LBL, DBBHL ve BuBuBL gibi olguların ayırıcı tanısında

yardımcı olarak kullanılmaktadır. Ancak pediatrik lenfomalarda proliferasyon aktivitesinin EBV ile ilişkisini sorgulayan çalışma azdır. Proliferasyon ve apoptoz ilişkili faktörlerin EBV ile tetiklenmesi altında yatan mekanizmalar günceldir. Tümör hücrelerinin sağ kalımına EBV de katılmaktadır (94).

#### **5.4.1. C-myc Protein Ekspresyonu**

C-myc hücrelerin G1 fazından S fazına geçişinde rol oynayan onkogendir. Artışı tumor gelişimi ile ilişkilidir. Birçok tümör grubunda yaygın çalışılmıştır. Burkitt lenfomalarda tanısal önemlidir (29-31). Patogeneizde EBV B lenfositlerin poliklonal aktivatörüdür. İn vitro normal B lenfositlerin aktivasyonu immortalizasyonla ilişkilidir. Malarya enfeksiyonu immunosüpresyon oluşturur. T hücre süpresyonu ortadan kalkınca poliklonal B lenfositler proliferere olur. Belki de translokasyona yatkın hücre popülasyonu çoğalır. Translokasyonla *myc* onkogeni deregüle olur şeklinde hipotezler oluşturulmaktadır.

### **5.5. Apoptoz ve Apoptoz İlişkili Faktörler**

#### **5.5.1. Apoptoz ve Karsinogenez**

Apoptoz programlı hücre ölümü olup, hücrenin bir tür intihar mekanizmasıdır (95-96). Morfolojik olarak hücre membranında bleb oluşumu, hücre hacminde azalma, nükleusta yoğunlaşma, DNA' nın nükleus içi nükleozom uzunluğundaki (yaklaşık 200Mbaz) fragmanlara endonükleotik kesimi ile karakterizedir. Tek başına bir hücreyi etkileyen, inflamatuvar yanıt oluşturmayan, enzimatik, enerji (ATP) gerektiren regülasyonlu bir olaydır (97,98). Kimyasal maddeler, kemoterapötik ilaçlar ve iyonize radyasyon gibi hasarlayıcılarla karşılaşan hücrede mitokondri bağımlı intrinsek yolaklı apoptoz başlamaktadır. Mitokondri'den açığa çıkan cytochrome-c Apaf-1'i aktive etmekte, bununla aktive olan pro-caspase-9 hemen arkasından Kaspaz-3'ü aktive edip apoptosome'u oluşturmaktadır. Hücre membranı dışındaki ölüm reseptörlerine bağlanan ligandların başlattıkları ve FADD ile hücreye ulaşan ölüm sinyali sürecine ise ekstrinsek yolak denir (99-102).

İnsan hücrelerinde programlı hücre ölümü, TNF- Alfa, Fas, TNF-bağımlı-apoptozis-uyarıcı-ligand (TRAIL) ve bu uyarıların ligandların kendilerine özgül reseptörleriyle birleşmeleri sonucu başlamaktadır. Hücre membranı üzerinde bulunan ölüm reseptörleri uyarılmaları sonucunda hücre-içi sinyalleri başlatırlar.

### **5.5.2. Apoptoz Değerlendirme Yöntemleri**

Apoptotik olayın mekanizması oldukça karışıktır. Bu karışıklık saptanmasına da yansımaktadır. Apoptotik hücreleri saptamadaki özgüllük ve duyarlılığın artırılması apoptotik hücreleri işaretleyecek teknik ve erken aşamadaki apoptotik hücrelerin de saptanabilmesine dayanmaktadır.

Bu amaçla en sık konvansiyonel sayım yöntemi yanında Apostain boyama, TUNEL yöntemi, Lamin-B boyama kullanılmış ve kullanılmaktadır. Lamin-B degradasyonu saptar. Yöntemler arası karşılaştırmalı çalışmalarda en düşük duyarlılık ve özgüllük lamin-B ile boyamada elde edilmiş olarak bildirilmektedir. Bu yöntemler apoptoz sürecinde farklı zamanları saptayan benzer fenomenlerdir (103-105).

Apostain boyama: Apoptozu saptamada en sık kullanılan yöntemlerden birisidir. İn situ olarak hücrelerde DNA denatürasyonu sağlandıktan sonra, tek sarmal DNA'ya karşı monoklonal bir antikorla enkübe edilir. Sekonder antikor ve renklendirici uygulanıp görüntüleme yapılır. Bu genelde primer antikora peroksidaz konjuge sekonder antikor ve peroksidaz substratı DAB bağlanmasına dayanır.

### **5.5.3. Bcl-2**

Lenfoid hücrelerin gelişimi hücre sağ kalım ve ölümünü kontrol eden moleküller arasındaki dengeye bağlıdır. Bcl-2 apoptoz inhibitörüdür. *Bcl-2* gen ürünü olan bu molekül sitokrom C'nin mitokondriden salınımını ve apoptoz aktive eden faktörlerin kaspaz 9 ve bax ile etkileşimlerini düzenler (40-46). EBV ile immortalize edilen B hücrelerdeki in vitro çalışmalar LMP-1 ile bcl-2 ekspresyonunun arttığını göstermektedir (1). Bu durum kemoterapiye genel olarak iyi yanıt veren HL'da bu iyi yanıtın potansiyel açıklaması olarak görülmüştür (31). EBV proteini olan BZLF-1 bcl-2 ile %25 sekans homolojisi göstermektedir. Burkitt lenfomada ve apoptozu baskıladığı gösterilmiştir (44). Bcl-2'nin viral homologları HL'da apoptoz düzenlenimine katılıyor olabilirler. BCL-2 ailesi proteinler (bag-1, bad, nips-1,2,3 ...) ile nitrik oksit, c-myc deregülasyonu EBV ilişkili tümörlerde apoptoz mekanizmasını etkiliyor olabilirler (47).

Mitokondri membran geçirgenliği, proapoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 gen ailesi üyeleri ile kontrol edilmektedir. Proapoptotik Bcl-2 gen ailesi üyelerinden Bak ve Bax Bcl-2 proteini Bid'in doğrudan BH3-domainine bağlanır. Diğer BH3-proteinleri arasında olan (Noxa, Puma, Bad ve Bin)'in anti-apoptotik görev yapan Bcl-2 proteinlerine (Bcl-2 ve Bcl-XL) bağlanması sonucunda Bax ve Bak inaktive olmaktadır.

#### **5.5.4. Bax**

Bax (Bcl-2 associated X protein) bcl-2 onkoproteini ile homoloji gösteren bir proteindir. *Bcl-2* geninin BH1 ve BH2 bölgeleri ile homoloji gösterir. Apoptozun düzenlenmesinde görev alırlar. Bax artışı programlı hücre ölümü ile paraleldir. Yani bir hücre ölüm agonistidir (108). Bcl-2 ailesi proteinler apoptotik uyarana duyarlılığın göstergesidirler. Apoptotik hücre ölümünü mitokondri membranına girip, BCL-2'ye bağlanıp bloklayarak, sitokrom C'yi açığa çıkararak uyarır. BCL-2 ve Bax'ın baskın olmasına göre apoptoz dengelenir. Birçok tümör grubunda olduğu gibi lenfomalarda da yaygın çalışılmıştır (67). Apoptoz uyarıcı gen olan bax ekspresyonu HL'da HRS hücrelerinde sık bulunmuştur. Bax, hasarlı DNA sı olan hücrede apoptozu uyarır. Lenfoma gelişiminde rolü olduğunu düşündürten çalışmalar vardır. Hodgkin lenfomada ise %90 dolaylarında HRS hücrelerinde saptanmıştır (106). Ancak prognostik önemi saptanmamıştır.

#### **5.5.5. P53**

P53 hücre siklus düzenlenimi, DNA onarımı ve apoptozda rolü olan bir nükleer proteindir. Çocukluk çağı lenfomalarda prognostik çalışmalar vardır (27). EBV ile ilişkisinin araştırılması günceldir. Çocukluk çağı lenfomalarda ayrıntılı moleküler patogenezi çalışmaları sürmektedir (32). Hodgkin lenfomalarda immortalizasyon ve tümör gelişim mekanizmalarının tam olarak aydınlatılması olası tedavi hedefleri açısından çok çalışılmaktadır. İmmortalizasyonda p53 ve apoptoz yer almaktadır (33-39). P53 iyi bilinen bir tümör süpresör genidir. G1 fazında hücre siklusu arresti oluşturur, bax geni ekspresyonunu uyarır. P53 proteini hücrel stresin en iyi indikatörüdür. P53'de pro-apoptotik Bcl-2 gen ailesinin transkripsiyonel aktivasyonunu sağlayarak ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerini (Bcl-2, Bcl-XL) suprese ederek apoptozu engellemektedir. Kim ve arkadaşları HL'da RSH hücrelerinde p53 ekspresyonunun EBV ile ilişkisiz bulmuşlardır.

#### **5.5.6. Fas**

CD95 (fas) birçok hücre tipinde özellikle bazı lenfoid hücre hatlarında apoptozu uyarıcı hücre membran proteindir. Hücre içi apoptoz sinyallerini uyarır. Tümör nekroz faktör/nevrogrowth faktör reseptör ailesindedir. Bazı lenfomalarda fas aracılı ölüm sinyallerinde yetersizliği düşündürtecek fas mutasyonları saptanmıştır. CD95 aracılı apoptoz bcl-2 protoonkogeninin ekspresyonu ile en azından parsiyel olarak inhibe olur. CD95 reseptörü ve



ligandı ilaç uyarımlı apoptozda yer almaktadır (48-54).

### **5.5.7. Survivin**

Survivin apoptoz inhibitörü ve hücre bölünme düzenleyicisidir. Birçok kanserde reaktivasyon düşündürtecek ekspresyonu saptanmıştır (nazofarinks karsinomu, mesane, akciğer, over karsinomu, bazı lenfomalar, pankreas kanseri, nöroblastom) (55-62). Embriyonik ve fötal gelişimde sık rastlanır. Erişkin dokularda downregüle olur. İnsan malign transformasyon gösteren hücre hatlarında ve tümör dokularda reekspresyonu saptanmıştır. Apoptoz inhibitör ailesinin üyesi, ve önemli bir mitoz düzenleyicisidir. Mitotik iplikçiklerin mikrotübülleri ile kombine olabilir (66). Kaspazlarla etkileşime girebilir. Apoptozu kaspaz 3 ve 7 aktivitesini inhibe ederek ya da kaspaz-9 ile konjuge olarak bloke ettiği düşünülür (65). İHK'sal çalışmalarda nükleer ekspresyonun değerlendirilmesi prognostik değerlendirmelerde daha değerli olarak vurgulanmaktadır (67). Survivin 17q25 kromozomal lokalizasyonda yer alır. 16.5 KD protein kodlar (69). Kolorektal karsinomda evre, lenf düğümü metastazı ve patolojik derece ile survivin ekspresyonu istatistiksel ilişkili bulunmuştur (69). LMP-1'in survivin ekspresyonunu nükleus translokasyonunu arttırarak uyardığı yönünde çalışmalar vardır (55). Antisense oligonükleotidler ile survivini downregüle edip apoptozu uyarma, tümör büyüme potansiyelini azaltma amaçlı çalışmalar dikkati çekmektedir (65). Survivinden derive bir peptidin potansiyel bir immünolojik kanser aşısı olabileceği yönünde çalışmalar sürmektedir (63), faz 1 çalışma sonuçları yayınlanmaya başlamıştır (68). Survivin'in 2 $\alpha$ , 2B, 2 $\Delta$ , 3B gibi farklı alternatif splicing formları vardır (64).

## **6. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

### **6.1. Olgular ve Doku Örnekleri**

Bu çalışmaya 1989-2005 yıllarında tanı almış, tedavi edilmiş ve izlenmekte olan yaşları 2-15 arası 63 HL olgusu ve 1992-2005 yılları arasında tanı almış, tedavi edilip izlenmekte olan yaşları 1-15 arası 70 NHL olgusu dahil edilmiştir. Olgular Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Onkoloji Servisi ve Polikliniğinde izlenmektedir. Bu süreçte toplam 88 HL ve 97 NHL olgusu başvurmuştur. Doku takibi ve parafin bloklaşması kurumumuzda yapılmış olan ve tedavi ve izlemleri olan olgulardan arşivde uygun parafin bloğuna ulaşılanlar çalışmaya alınmışlardır. İmmün yetmezlik ilişkili olgular çalışma dışı bırakılmıştır. Olgular HL için Ann Arbor ve NHL için St.Jude sistemine göre evrenlenmişlerdir. Tedavi süreci ve sonrasında belirli protokolle düzenli aralıklarla fizik muayene, laboratuvar ve görüntüleme yöntemleri ile izlenmişlerdir. Olgulara ait hematoksilen eosin arşiv preparatları yeniden incelenmiş, tanı doğrulanmıştır. Eski yıllara ait ve eksik olan olgulara HL için LCA, CD30, CD15, CD20, CD3; NHL için CD3, CD20, TdT uygulanmıştır. Olgulara ait tanıyı temsil eden bir adet parafin blok seçilmiştir. Bu bloktan polilizinli lamlara 5 mikrometre kalınlıkta kesitler hazırlanmıştır. Boyama sürecine dek kesitler oda ısısında bekletilmiştir.

### **6.2. Parafine Gömülü Arşiv Dokusunda Floresan İn Situ Hibridizasyon**

#### **6.2.1. Genel İlke:**

Latent olarak EBV ile enfekte hücreleri tanımaya dayanır. EBER latent enfekte olan hücrelerin nükleusunda birikir. EBER hücre protein sentezini engelleyen molekülleri (Ökaryotik initsiyasyon faktör 2a) bağlayarak hücre proliferasyonuna katkı yapar.

Parafine gömülü fikse dokuda çalışılabilir. Çünkü formalin RNAazları inhibe eder. EBV probu floresan işaretli oligonükleotid koktaili içerir. Bu prob çalışılan dokudaki hücrelerin nükleusunda bulunan EBER'e hibridize olur. Anti-FITC uygulanıp vizüalize edilir.

#### **6.2.2. Uygulama Basamakları:**

- Olgulara ait, lizinli lamlara alınan 5 mikrometre kalınlığında kesitleri içeren lamlar 60° C etüvde bir gece bekletildi.
- 6 dakika ksilen içinde bekletildi.

- Absolut alkolde 6 dakika oda ısısında bekletildi.
- %95 etil alkolde 3 dakika bekletildi.
- Distile suda 3 dakika bekletildi.
- Taze hazırlanmış proteinaz K (5µg/ml TRİS içinde) lamlara damlatılarak 37° C'da etüv içinde 30 dakika enkübe edildi.
- Distile suda 6 dakika bekletildi.
- %95 etil alkolde oda ısısında 3 dakika bekletildi.
- Absolut alkolde 6 dakika oda ısısında bekletildi.
- Lamalar havada kurutuldu.
- Lam başına 20 mikrolitre primer (EBER) (1:200 TRİS ile sulandırılmış) damlatılıp lamelle doku üzeri kapatıldı. 37° C'da etüvde 2 saat enkübe edildi.
- Lameller nazikçe çıkarıldı.
- Şalede TRİS tampon içinde 10 dakika yıkandı.
- TRİS ile 1:5 sulandırılmış blokan serum lamlara damlatıldı. Oda ısısında 10 dakika uygulandı.
- Lamalar üzerindeki fazlalık yıkamadan döküldü.
- Karanlık ortamda 1:200 TRİSle sulandırılmış Anti-FİTC 30 dakika lamlara damlatılıp oda ısısında uygulandı.
- TRİS tampon solüsyonunda 6 dakika karanlık ortamda oda ısısında yıkandı.
- Alkelen fosfotaz 5 dakika uygulandı.
- TRİS tampon solüsyonunda 10 dakika karanlık ortamda yıkandı.
- MgCl<sub>2</sub> eklenmiş pH 9 TRİSde hazırlanmış AP tamponunda karanlık ortamda 5 dakika yıkandı.
- 1:50 AP tamponu ile dilüe edilmiş enzim substrat vialine 1mikrolitre/mililitre olacak şekilde inhibitör olarak levamizol eklendi.
- Lamellerle kapatılıp oda ısısında karanlıkta gece boyunca (16 saat) enkübe edildi.
- Lameller nazikçe kaldırılıp şalede akar çeşme suyunda 5 dakika yıkandı.
- Gliserin ile kapatılıp karanlık ortamda floresan mikroskopta mavi filtre ile gözlem yapıldı. Yeşil floresan veren hücreler gözlemlendi. Işık mikroskobisinde pozitiflik koyu kirli mavi olarak gözlenmektedir.

### 6.3. İmmünohistokimya

#### 6.3.1. Genel İlke:

İşaretlenmiş antikor yöntemi ile antijeni tanıma ve gösterme temel ilkesine dayanmaktadır. Avidin- Biotin kompleksi teknolojisi kullanılır. Avidin bir glikoproteindir. Biotine afinitesi çok fazladır. Biotin antikorlara spesifik bağlanma bölgesinde kayıp oluşturmadan bağlanabilir. Üretilen ve daha sensitif bir molekül olan streptavidin peroksidaz ekli olarak nötral, hafif alkalın pH'da yalnızca biyotinlenmiş sekonder antikora bağlanır. Oluşan kompleks Kromojenik substrat eklenerek görünür hale getirilir. Antijenin bulunduğu bölgede renkli bir çökelti oluşur.

#### 6.3.2. Uygulama Basamakları:

- İmmünohistokimya için manuel yöntem uygulandı.
- Olgulara ait lizinli lamlara alınan 5 mikrometre kalınlığında kesitleri içeren lamalar 60° C etüvde bir gece bekletildi.
- 2x 30 dakika ksilen içinde oda ısısında bekletildi.
- Etil alkol konsantrasyonu azalan serilerinden geçirildi (%95, 90, 80, 70).
- Distile suda 10 dakika bekletildi.
- %3 hidrojen peroksit içinde oda ısısında 15 dakika bekletildi.
- 5 dakika distile suda yıkandı.
- LMP-1 için 37° C etüvde tripsin solüsyonu içinde 30 dakika enkübe edildi. 5 dakika distile suda yıkandı.
- Sitrat tampon içinde (pH: 6) plastik kapakları kapalı şaleler içinde mikrodalga fırında 400 watt' da 30 dakika kaynatıldı.
- Oda ısısında soğuyuncaya dek bekletildi.
- Distile suda 10 dakika yıkandı.
- PBS de (pH: 7.4) oda ısısında 10 dakika bekletildi.
- Lamalar üzerinde dokular sınırlayıcı kalemle dokulara değdirmeden çevreleyerek çizildi.
- Blokan solüsyon dokuları kaplayacak kadar damlatılıp 5 dakika uygulandı.

- Fazlası dökülüp yıkama işlemi yapılmadan ve dokular kurumadan primer antikor 60 dakika uygulandı. Kurumayı önlemek için oda ısısında nemli ortamda lamlar kapalı kutular içinde bekletildi.
- PBS tampon içinde 10 dakika yıkandı.
- Anti polivalent biyotinli antikor oda ısısında 30 dakika uygulandı.
- PBS tampon içinde 10 dakika yıkandı.
- Bayırturbu Peroksidazı (HRP) ekli streptavidin oda ısısında 30 dakika uygulandı.
- PBS tampon içinde 10 dakika yıkandı.
- DAB hidrojen peroksitli hazır solüsyonu ile 1:20 oranında karıştırıldı. Lamlar üzerine 10 dakika uygulandı. Distile suda 1 dakika ve akar çeşme suyunda 5 dakika yıkandı.
- Harris hematoksilen ile 30 saniye zıt boyama uygulandı. Akar çeşme suyunda bayadan arınana dek yaklaşık 5 dakika yıkandı.
- Konsantrasyonu artan etil alkol serilerinden geçirildi (70-80-90-95).
- Havada kurutuldu. Ksilen içinde 30 dakika bekletildi. kapama maddesi\_damlatılıp lamel ile kapatıldı.
- Işık mikroskobu ile değerlendirme yapıldı.

#### **6.4. TUNEL Boyaması**

##### **6.4.1. Genel İlke**

Tek hücre düzeyinde apoptotik hücreleri saptamaya yarayan hızlı, basit, doğruluk oranı yüksek radyoaktif olmayan bir sistemdir. Hem doku kesitlerinde hem kültür hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü saptar. Nükleer DNA fragmentasyonunu saptamaya dayanan biyokimsyal bir indikatördür. Apoptoza giden hücreler membrana bağlı apoptotik cisimciklere fragmente olurlar. Apoptotik hücrenin nükleusunda endojen endonükleazlarla DNA 180-200 baz çifti multimerlere fragmente olur. Biyotinlenmiş nükleotid rekombinant terminal deoksinükleotidil transferaz ile fragmente DNA'nın 3'-OH ucuna inkorpore olur. Daha sonra bu biyotinlenmiş nükleotide bayırturpu peroksidazı işaretli streptavidin bağlanır. Kromojen DAB ile görünür hale getirilir.

##### **6.4.2. Uygulama Basamakları**

- 1.Olgulara ait lizinli lamlara alınan 5 mikrometre kalınlığında kesitleri içeren lamlar 60° C etüvde bir gece bekletildi.

- 2x 5 dakika ksilen içinde bekletildi.
- Etil alkol azalan serilerinden geçirildi (%95, 90, 80, 70).
- %50 etil alkolde 5 dakika bekletildi.
- % 0.85 NaCl solüsyonunda oda ısısında 5 dakika bekletildi.
- PBS içinde 5 dakika yıkandı.
- % 4 paraformaldehit solüsyonunda oda ısısında 15 dakika bekletildi.
- PBS içinde 2x5 dakika yıkandı.
- Dokular sınırlayıcı kalemle çerçeveselendi.
- Taze hazırlanmış proteinaz K (20µg/ml PBS içinde) lamlara damlatılarak oda ısısında 10 dakika enkübe edildi.
- PBS içinde 5 dakika yıkandı.
- % 4 paraformaldehit solüsyonunda oda ısısında 5 dakika bekletildi.
- PBS içinde 2x5 dakika yıkandı.
- Dilüe hazır halde bulunan equilibrasyon tamponundan dokuları kaplayacak kadar damlatıp 7 dakika oda ısısında bekletildi.
- Fazlalık tampon lamlar üzerinden döküldü.
- Equibrasyon tamponu, biyotinli nükleotid karışımı, rTdT enzimi 98:1:1 oranında buz kalıbı üzerinde soğuk ortamda acil karıştırıldı. Hazırlanan reaksiyon karışımından lam başına 100 mikrolitre damlatılarak plastik coverslipler ile lamların doku ve solüsyon olan bölgeleri kapatıldı. 37° C' da 60 dakika etüv içinde çevresine nemli ortam hazırlamak için kaynar su kapları konularak tutuldu.
- Etüvden alınan lamların plastik coverslipleri nazikçe çıkarıldı.
- 20xSSC solüsyonu distile su 10 kat sulandırıldı.
- 2xSSC de şale içinde oda ısısında 15 dakika tutuldu.
- PBS içinde 3x5 dakika yıkandı.
- PBS ile sulandırılan %0.3 hidrojen peroksit içinde oda ısısında 5 dakika tutuldu.
- PBS içinde 3x5 dakika yıkandı.
- Streptavidin HRP solüsyonu PBS ile 1:500 sulandırıldı. Her lama dokuyu kaplayacak kadar damlatıldı. Oda ısısında 30 dakika tutuldu.
- PBS içinde 3x5 dakika yıkandı.

- DAB substrat, distile su, DAB kromojen 20X, Hidrojen peroksit 20X, 5:95:5:5 oranında taze olarak karıştırıldı.
- DAB solüsyonu lamlara dokuları kaplayacak kadar damlatıldı. 10 dakika oda ısısında tutuldu.
- Distile suda 3x3 dakika yıkandı.
- 60 saniye Harris hematoksilen ile zıt boyama uygulandı.
- Çeşme suyunda yıkandı. gliserol damlatılıp lamel ile kapatıldı.
- Işık mikroskobu ile gözlem yapıldı.

## 6.5. Değerlendirme

### *Apoptotik İndeks Saptanması:*

HL için tüm alanda sayılabilen Hodgkin hücrelerinde, NHL da diffüz tümör dokusunda 5000 hücre sayılarak TUNEL yöntemi ile kahverengi boyanmış hücrelerin oranı yüzde olarak hesaplandı. Ayrıca H.E boyalı kesitlerde nekroz alanları, küçük nekroz odakları dikkate alınmadan apoptotik hücreler konvansiyonel yöntemle şekilleri değerlendirilerek aynı sayıda hücrelerde sayılıp oranlandı. Sitoplazmaları büzüşmüş koyu eozinofilik, koyu nükleuslu, kromatini nükleer membran altında kaba granüller halinde fragmente nükleuslu veya hilal şeklinde olan HL için mumifiye olan hücreler şekilsel değerlendirmeye alındı.

## 6.6. Kullanılan Solüsyonlar, Kimyasal Maddeler, Gereçler

### *6.6.1. Kullanılan Solüsyonlar*

- Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (PBS)
  - 150 mM NaCl+ 10nM Na-Fosfat, pH 7.4
- TRİS; 11.1 gr + 940 ml bdH<sub>2</sub>O+ 7 ml HCl (pH 7.2)
- %3 Hidrojen Peroksit solüsyonu (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Sitrat Tampon Çözeltisi: pH 6
  - Sitrik asid, kuru toz: 0.399 g
  - Sitrik asid tri Sodyum Sitrat 2.382 g, 1 L su içinde eritilir.
- Proteinaz K stok çözeltisi: 10 mg/ml
  - 50 mM Tris pH 8 +5 mM EDTA -20°C saklandı.
  - Kullanma çözeltisi: 20 µg/ml stok çözeltisi Tris-Edta ile 500 kat seyreltildi.

- %4 paraformaldehit (PFD)+ %0.2 gluteraldehit (GA) solüsyonu
  - 150 ml PBS içinde, 60°C’de 6 g PFD eritildi, soğuyunca 1.2 ml %25 GA eklendi +4°C’de saklandı (saklama ömrü 1 hafta).
- 20xSSC
  - 3M NaCl+ 0.3 M Na-sitrat, pH 7
- 0.5 M EDTA, pH 8
  - 14.6 g EDTA bdH<sub>2</sub>O ile 100 ml tamamlandı. NaOH ile pH ayarlandı.

### 6.6.2. *Kimyasal Maddeler*

- Etil Alkol %96 10 L
- Xylene 5 litre
- Kapatma maddesi (mounting medium (Surgipath Micromount) 120 ml
- PBS tampon solüsyonu için hazır toz karışım (ScyTek) 100 g
- Proteinaz K 100mg, Sigma P-2308
- Blocking Reagent 50 gram (Roche)
- EDTA 100 gram (Sigma)
- Tris, Sigma T-1378, 20 gram
- Paraformaldehyde 100 g (Appli Chem)
- Sodyum Sitrat 100 g (Merck)
- MgCl<sub>2</sub> 10 g (Sigma)
- Epstein Barr Virüs (EBV)LMP (immunhistokimyasal kit) pürifiye 150 lam için
- EBV-EBER (In situ hibridizasyon kiti)150 lam için özel yıkama solusyonları ile birlikte
- (immunhistokimya üniversal kit) rabbit/mouse LSAB 100 ml (ScyTek)
- DAB kromojen 5 ml (SkyTek)
- DAB substrat 100 ml (SkyTek)
- ISH deteksiyon kiti Novocastra NCL-ISH-D floresan konjuge prob için. 2 set
  - Vial A rabbit F Anti-FITC/AB 0.50ml
  - Vial B enzim substrat 0.8 ml
  - Vial C inhibitör Levamisole 0.3ml



- Rubber cement 40 g
- Pronase E (streptomyces) 100mg
- Glycerin 500 ml
- Anti-CD3 (DAKO) 2 ml dilüe
- TdT (DAKO A-3524) 0.1 ml 1:100 PBS ile dilüe edildi.
- Anti-CD20 (DAKO, N1502) 2 ml dilüe
- CD30 Ab-1 (Ber-H2) (Neomarkers, MS361R1) 1 ml dilüe
- bcl-2 $\alpha$  Ab-3 mouse monoklonal antikor (Labvision) 0.5 ml (200 $\mu$ g/ml) 1:100 PBS ile dilüe edildi.
- Survivin Ab-2 mouse monoklonal antikor (Labvision) 0.5 ml (200 $\mu$ g/ml) 1:100 PBS ile dilüe edildi.
- Bax (Apoptosis marker) Ab-1 mouse monoklonal antikor (Labvision) 0.5 ml (200 $\mu$ g/ml) 1:100 PBS ile dilüe edildi.
- P53 SP5 (Neomarkers, RM9105S1) 0.5 ml (200 $\mu$ g/ml) 1:100 PBS ile dilüe edildi.
- fas Ab4, CD95 (Neomarkers, RB1517P1) 0.5 ml (200 $\mu$ g/ml) 1:100 PBS ile dilüe edildi.
- ki-67 SP-6 (Neomarkers, RM9106SO) 0.1 ml (200 $\mu$ g/ml) 1:100 PBS ile dilüe edildi.
- c-myc monoklonal mouse anti human (DBS) 1 ml, 1:50 PBS ile dilüe edildi.
- 0.85% NaCl 2 litre
- Tunel deteksiyon sistemi G7130 Promega
  - Equilibration tamponu 38.4ml
  - Streptavidin HRP 160 $\mu$ l
  - Biotinylated Nucleotide (0.5mg/ml) 160 $\mu$ l
  - DAB 20X Chromogen 800 $\mu$ l
  - Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Recombinant 160 $\mu$ l
  - DAB Substrate Buffer 20X 800 $\mu$ l
  - Hydrogen Peroxide 20X 800 $\mu$ l
  - Plastic Coverslip 140 adet
  - SSC, 20X (2  $\times$  20) 280ml
  - Proteinase K 40mg

### 6.6.3. Kullanılan Gereçler

- Mikrotom,..... Leica RM2125RT
- Su banyosu .....Teknişik
- Mikroskop, .....Nikon E400
- Mikrodalga Fırın, .....Arçelik MD551
- Etüv..... Nüve FN500
- Tartı..... Shimadzu AY120
- pHmetre..... NEL elektronik pH 890
- Otomatik pipet 0.5-10µl.....DiaMed-ID pipette FP-5
- Otomatik pipet 20-200µl..... ISOLAB
- -20°C derin dondurucu.....Ufuk
- +4 °C buzdolabı..... Arçelik 450 lux
- Polilizinli lam 1500 adet.....ISOLAB
- Plastik pipet ucu sarı ve mavi birer paket..Kartell Spa
- Sınırlayıcı kalem 1 adet.....DAKOpen
- Lamel 22x22 mm 1500 adet.....ISOLAB

### 6.7. İstatistik Yöntem

Mikroskopik değerlendirmede EBER, Imp-1, bax, bcl-2, fas, survivin, c-myc, p53 için pozitif ve negatif olarak nonparametrik değerlendirme yapılırken, apoptoz, tunel ve ki-67 için sayısal değerler alınmıştır. İstatistik yöntem olarak,  $\chi^2$  , Mann Whitney U test, Pearson Korelasyon Analizi, Kaplan Meier ve Log Rank sağ kalım analizi kullanılmıştır.

## **7. BULGULAR**

### **7.1. Olgulara Genel Bakış**

#### **7.1.1. HL: Olgulara Genel Bakış**

HL olguların 42'si erkek 21'i kız çocuğudur. Ann Arbor sınıflamasına göre evrelenen olgularımızdan, 32 olgu evre I ve II, 31 olgu evre III ve IV'dür. Yaş ortalaması  $8.46 \pm 3.54$  (2-15) olup olguların 33'ü mikst sellüler, 15'si nodüler sklerozan, 8'i lenfositten zengin ve 7'si lenfositten fakir tiptedir (Resim 1). Kasım 1996 tarihine kadar tam alan olgular, erken evrede üç kür, ileri evrede altı kür ABVD-COPP ve 2500-4000 cGy tutulu alan radyoterapi almıştır. Bu tarihten sonraki olgular GPOH-HD95 protokolü ile tedavi edilmiştir. Olgularımızın tümü klasik HL olup tümünde HRS hücreleri CD30 pozitifdir. CD15 %78 olguda pozitif saptanmıştır. LCA tümünde negatiftir. EBV 52 (%82.5) olguda pozitifdir. Dört olguda exitus, 6 olguda rekürrens saptanmıştır. Genel sağkalım %94, olaysız sağkalım %83.6' dır. Tüm EBV pozitif olgularda LMP-1 ve EBER birlikte pozitif bulunmuştur. Mikst sellüler tipte EBV pozitifliği %93.9 iken, lenfosit zengin tipte %75, lenfositten fakir tipte %71.4, nodüler sklerozan tipte %66. Tiplere göre EBV-prognoz ilişki olgu sayısı alt guruplara ayrıldığında istatistiksel yeterli olmadığı için değerlendirilememiştir. Olguların özellikleri Tablo 3'dedir.

#### **7.1.2 NHL: Olgulara Genel Bakış**

NHL olguların 46'sı erkek, 24'ü kız çocuğudur. St.Jude evreleme sistemine göre evre I veya II'de yedi olgu, evre III veya IV'de 63 olgu vardır. Yaş ortalaması  $7.16 \pm 3.72$  (1-15)' dir. On iki olgu prekürsör T LBL, 35 olgu BuBuBL, 11 olgu DBBHL, 9 olgu ABHL (ki-1+) (T fenotipinde) ve 3 olgu periferik T hücreli (ikisi enteropati ilişkili, birisi NOS)'dir (Resim 2). Olgulara 1994 sonrası BFM-90 tedavi protokolü, öncesi 20 olguya Modifiye Ziegler ya da COMP protokolü uygulanmıştır. On sekiz olguda (%25.7) EBV pozitifliği saptanmıştır (Resim 3). On olguda eksitus, dört olguda rekürrens saptanmıştır. Genel sağ kalım %82, olaysız sağkalım %75'dir. NHL olgularının genel özellikleri Tablo 4'de verilmiştir.

### **7.2. İmmunhistokimya , FISH ve TUNEL Bulguları**

#### **7.2.1. HL: İmmunhistokimya , FISH ve TUNEL Bulguları**

HL serimizde 52 olguda hem EBER hem LMP-1 pozitifdir (Şekil 1). Proliferasyon indeksi (Pİ) ortalama %57,8 (%20-100) saptanmıştır (Şekil 2). Aİ 100 HRS hücresinde ortalama  $18,22 \pm 16,52$  (1-75) sayıda izlenmiştir (Şekil 3). C-myc 16 olguda (%25.4) (Şekil 4), survivin 27 olguda (%43) (Şekil 5), bax 47 olguda (%74.6), bcl-2 30 olguda (%47.6), p53 21 olguda (%33.3), fas 34 olguda (%54) ve pozitif saptanmıştır (Resim 3).

### **7.2.2. NHL: İmmunhistokimya, FISH ve TUNEL Bulguları**

NHL serimizde 7 olguda LMP-1 ve EBER birlikte pozitif iken 11 olguda LMP-1 negatif, EBER pozitif bulunmuştur (Şekil 6). Pİ ortalama %55,97 (%12-%92) sayıda izlenmiştir (Şekil 7). Aİ 5000 hücrede ortalama 131,29±96,69 (20-450) olarak saptanmıştır (Şekil 8). Ortalama AP/Pİ: 2,637869 iken EBER negatif olgularda 2,5219 ve EBER pozitif olgularda 2,9728 olarak saptanmıştır. Bax 28 olguda (%40), survivin 30 olguda (%42,9), p53 altı olguda (%8,6), fas 13 olguda (%18,6) (Şekil 9,10), bcl-2 35 olguda (%50) (Şekil 11) ve c-myc 32 olguda (%45,7) pozitif saptanmıştır (Resim 4). BuBuBL olguların %88'i c-myc pozitif iken, LBL'da %16,7, DLBCL'da %9.1 pozitiflik vardır. ABHL ve PTHL'lar tümü negatiftir (Şekil 12). HL ve NHL olgularımızda EBER pozitifliği Resim 5'de TUNEL'de apoptotik hücreler Resim 6'da gösterilmiştir.

### **7.3. İstatistik Bulgular**

#### **7.3. 1. HL: İstatistik Bulgular**

Histolojik tipler, yaş ve cinsiyet ile EBV pozitifliği arasında istatistiksel fark saptanmamıştır. Erken evre olgularda EBV pozitifliği daha fazladır (p=0,002, Pearson korelasyon analizi). EBV ile Aİ ters ilişkili bulunmuştur (p=0.021). EBV pozitif olgularda Aİ daha düşüktür. Yine EBV Aİ/Pİ oranı ile ters ilişkili saptanmıştır (p=0.003). Aİ ile Pİ oranladığımızda HL serimizde bu oranın EBER negatif olgularda daha yüksek olduğu saptanmıştır (p=0.05), tüm olgular ortalama 0.413, EBER negatif: 0,872; EBER pozitif: 0,316). EBER pozitifliği durumunda tek başına birisi ya da birlikte olarak apoptoz azalırken, proliferasyon artmaktadır. Apoptoz ilişkili faktörlerin EBV ile ilişkisi Tablo 4'dedir. EBV pozitif ve negatif olan olgular arasında bax, bcl-2, survivin, p53, fas, c-myc ifadesinde fark saptanmazken survivin bcl-2 ile ilişkili saptanmıştır (P=0,001). Araştırılan faktörler ile genel sağ kalım, olaysız sağkalım, tedaviye yanıt ilişkili bulunmamıştır (p>0.05) (Şekil 13, 14, 15).

#### **7.3.2. NHL: İstatistik Bulgular**

EBV ile fas ilişkili (p=0,0001), bcl-2, ters ilişkili bulunmuştur. C-myc, survivin ve bax ekspresyonu ilişkili bulunmamıştır. Tablo 6'da apoptoz ilişkili faktörler-EBV ilişkisi verilmiştir. Aİ ve Pİ EBV ile ilişkili bulunurken Aİ/Pİ ilişki saptanmamıştır (p=0,568). Korelasyon analizinde prognoz EBV ile ters ilişkili olmasına karşın, Long Rank analizde sağkalım ile EBV ilişkisi saptanmamıştır. Bcl-2 Aİ, c-myc, Pİ ile ters ilişkili saptanmıştır. Bax Aİ ile, fas p53 ile ilişkili bulunmuştur. Long Rank analizinde Pİ, Aİ, p53, bcl-2, survivin, fas, c-myc, bax genel ve olaysız sağ kalımı belirleyici bulunmamıştır (Şekil 16, 17, 18).

Tablo 3: Hodgkin Lenfoma Olgularının Genel Özellikleri

Olgu No	yaş	Cinsiyet	Histoloji	Evre	İzlem Ay	Olay	EFS Ay	Prognoz	Tedavi Yant	EBV	Fas	Cmyc	p53	Bax	Survivin	Bcl-2	Apoptoz	Prolifer. index
1	12	K	NS	2	54	yok	54	SAG	var	-	-	-	+	-	-	+	34	35
2	11	E	LF	4	1	var	1	EX	yok	-	-	-	-	+	-	-	26	45
3	7	K	NS	3	78	var	26	SAG	var	-	-	-	-	+	-	-	36	50
4	13	K	LF	4	67	yok	67	SAG	var	-	-	-	-	+	-	+	5	35
5	10	E	MS	4	120	var	47	SAG	var	-	+	-	-	+	-	-	32	50
6	8	E	NS	3	42	yok	42	SAG	var	-	-	+	+	+	+	+	62	35
7	10	E	NS	4	70	var	16	SAG	yok	-	+	-	-	+	+	+	32	40
8	7	E	NS	3	33	yok	33	SAG	var	-	-	-	-	+	+	+	75	20
9	10	E	MS	4	3	?	3	kayıp	?	-	-	-	-	-	+	+	6	100
10	6	E	LZ	2	110	yok	110	SAG	var	-	+	-	-	+	+	+	3	30
11	6	E	LZ	3	16	yok	16	SAG	var	-	+	-	-	+	+	+	3	55
12	11	E	NS	4	148	yok	148	SAG	var	+	-	-	-	-	-	-	41	25
13	5	E	LF	3	36	yok	36	SAG	var	+	-	-	-	-	-	-	6	80
14	13	K	MS	1	13	yok	13	SAG	var	+	-	-	-	-	-	+	9	80
15	14	E	MS	1	27	yok	27	SAG	var	+	+	+	-	-	-	+	21	50
16	10	E	MS	2	5	?	5	kayıp	?	+	+	+	+	-	-	-	9	65
17	7	E	MS	2	62	yok	62	SAG	var	+	+	-	-	-	-	-	4	40
18	7	E	MS	3	15	yok	15	SAG	var	+	+	-	-	-	-	-	6	85
19	9	E	NS	3	68	yok	68	SAG	var	+	+	+	+	-	-	+	3	50
20	12	E	MS	3	80	yok	80	SAG	var	+	+	-	+	-	-	+	31	100
21	5	E	MS	1	52	yok	52	SAG	var	+	+	+	+	-	-	-	27	35
22	10	E	LZ	3	1	?	1	kayıp	?	+	-	-	-	+	-	-	10	65
23	4	E	MS	2	26	yok	26	SAG	var	+	-	-	+	+	-	+	12	70
24	11	K	LZ	1	71	yok	71	SAG	var	+	-	-	-	+	-	-	16	35
25	2	E	MS	2	62	yok	62	SAG	var	+	-	-	-	+	-	-	5	50
26	2	K	MS	3	8	var	8	EX	yok	+	-	-	-	+	-	-	18	65
27	6	E	NS	3	53	yok	53	SAG	var	+	-	-	-	+	-	+	19	65
28	12	E	NS	3	85	yok	85	SAG	var	+	-	-	-	+	-	+	35	30
29	13	K	MS	2	9	yok	9	SAG	var	+	-	-	-	+	-	+	18	100
30	3	K	MS	1	4	?	4	kayıp	?	+	-	-	+	+	-	-	14	40
31	10	E	LF	3	7	var	7	EX	yok	+	-	+	+	+	-	-	1	90
32	3	K	MS	1	66	yok	66	SAG	var	+	-	-	+	+	-	-	28	96
33	14	K	NS	4	1	?	1	kayıp	?	+	+	-	-	+	-	-	21	40
34	9	K	MS	2	76	yok	76	SAG	var	+	+	-	-	+	-	-	5	30
35	11	E	NS	1	94	yok	94	SAG	var	+	+	+	-	+	-	-	25	30
36	5	E	MS	1	74	yok	74	SAG	var	+	+	-	-	+	-	-	19	60
37	5	E	MS	2	75	yok	75	SAG	var	+	+	-	+	+	-	-	2	60
38	10	E	NS	3	50	yok	50	SAG	var	+	+	-	+	+	-	-	23	40
39	14	E	MS	2	72	yok	72	SAG	var	+	+	-	+	+	-	-	20	96
40	5	K	MS	2	4	var	4	EX	?	+	+	+	+	+	-	-	7	90
41	4	E	LZ	2	105	yok	105	SAG	var	+	+	-	+	+	-	+	6	100
42	7	K	MS	3	70	yok	70	SAG	var	+	+	+	+	+	-	-	20	75
43	13	E	MS	2	32	yok	32	SAG	var	+	-	-	+	-	+	+	42	100
44	7	E	MS	1	8	yok	8	SAG	var	+	+	+	-	-	+	-	5	50
45	15	E	LF	4	5	yok	5	SAG	var	+	+	+	-	-	+	+	4	85
46	11	E	MS	3	50	yok	50	SAG	var	+	+	-	-	-	+	+	8	50
47	6	K	MS	3	36	yok	36	SAG	var	+	-	+	-	+	+	+	32	96
48	15	K	NS	2	29	var	18	SAG	var	+	+	-	+	+	+	-	59	50
49	4	K	LZ	1	88	yok	88	SAG	var	+	-	+	-	+	+	+	8	60
50	7	E	MS	2	90	var	74	SAG	var	+	+	-	-	-	+	+	3	65
51	7	K	LZ	3	127	var	37	SAG	var	+	-	-	-	+	+	-	1	45
52	3	K	MS	1	25	yok	25	SAG	var	+	+	+	+	+	+	+	24	50
53	7	E	MS	1	115	yok	115	SAG	var	+	+	-	-	+	+	+	3	55
54	13	K	LF	3	112	yok	112	SAG	var	+	-	-	-	+	+	-	2	30
55	4	E	MS	2	8	yok	8	SAG	var	+	-	-	-	+	+	-	16	25
56	11	E	NS	2	12	yok	12	SAG	var	+	-	+	-	+	+	-	31	25
57	6	K	MS	4	30	yok	30	SAG	var	+	-	-	-	+	+	+	15	35
58	8	E	LF	4	86	yok	86	SAG	var	+	+	-	-	+	+	+	1	30
59	10	K	NS	3	15	?	15	kayıp	var	+	+	+	-	+	+	+	29	45
60	4	E	MS	1	4	?	4	kayıp	var	+	+	-	-	+	+	+	6	80
61	10	E	MS	3	75	yok	75	SAG	var	+	+	-	-	+	+	+	55	80
62	12	E	LZ	1	6	yok	6	SAG	var	+	+	-	+	+	+	-	2	55
63	7	E	MS	2	58	yok	58	SAG	var	+	+	-	+	+	+	+	7	100

Tablo 4: NonHodgkin Lenfoma Olgularının Genel Özellikleri

Olgu No	yaş	Cinsiyet	Histoloji	Fenotip	Evre	İzlem Ay	Olay	EFS Ay	Prognoz	Tedavi Yanıt	EBV	Fas	Cmyc	P53	Bax	Survivin	Bcl-2	Apoptoz	Ki67 index
1	2	K	LBL	B	4	25	var	10	ex	var	-	-	-	-	-	+	+	25	12
2	17	K	LBL	T	4	16	var	13	ex	yok	-	-	-	-	-	+	+	45	21
3	1	K	LBL	T	1	29	yok	29	sağ	var	-	+	-	-	-	-	-	60	17
4	13	K	LBL	T	4	154	yok	154	sağ	var	-	-	+	-	-	-	+	60	28
5	7	E	LBL	T	3	122	yok	122	sağ	var	-	-	-	-	-	+	+	60	22
6	13	K	LBL	T	3	153	yok	153	sağ	var	-	-	-	-	+	+	+	70	28
7	7	K	LBL	T	3	54	var	12	relaps	var	-	-	+	-	+	+	+	85	21
8	7	E	LBL	T	4	168	yok	168	sağ	var	-	-	-	-	-	+	+	90	27
9	1	E	LBL	T	2	4	yok	4	izldışı	yok	-	-	-	-	-	-	+	110	25
10	9	E	LBL	T	4	6	var	6	ex	yok	-	-	-	-	-	+	+	120	23
11	13	K	LBL	T	3	169	yok	169	sağ	var	-	-	-	-	-	-	+	120	21
12	10	E	LBL	T	3	3	var	3	ex	yok	-	-	-	-	-	+	+	140	22
13	14	E	BuBuBL	B	3	112	yok	112	sag	var	-	-	+	-	-	+	+	50	72
14	4	E	BuBuBL	B	3	10	yok	10	sag	var	-	-	+	-	-	-	-	90	92
15	9	K	BuBuBL	B	3	10	yok	10	sag	var	-	-	-	-	-	-	-	95	87
16	5	E	BuBuBL	B	3	166	yok	166	sag	var	-	-	+	-	-	-	-	100	72
17	5	E	BuBuBL	B	4	54	var	17	relaps	yok	-	-	+	-	-	-	+	100	78
18	10	E	BuBuBL	B	3	63	yok	63	sag	var	-	-	+	-	+	-	-	120	77
19	9	K	BuBuBL	B	3	44	yok	44	sag	var	-	-	-	-	-	-	-	170	81
20	5	K	BuBuBL	B	3	119	yok	119	sag	var	-	-	+	-	+	-	-	290	86
21	4	E	BuBuBL	B	3	54	var	21	relaps	yok	-	-	+	+	-	-	-	310	81
22	5	E	BuBuBL	B	3	6	yok	6	kayıp	yok	-	-	+	-	+	-	-	450	79
23	4	E	BuBuBL	B	3	2	var	2	ex	yok	+	-	+	-	+	-	+	45	85
24	7	K	BuBuBL	B	4	9	yok	9	sag	var	+	+	+	+	+	+	-	85	78
25	7	E	BuBuBL	B	3	76	yok	76	sag	var	+	+	+	-	+	-	-	90	78
26	5	K	BuBuBL	B	3	3	var	3	ex	yok	+	-	+	-	-	+	-	100	84
27	5	E	BuBuBL	B	1	30	yok	30	sag	yok	+	+	+	-	-	-	-	100	78
28	5	E	BuBuBL	B	3	37	yok	37	sag	var	+	+	-	+	-	+	-	150	82
29	4	E	BuBuBL	B	3	132	yok	132	sag	var	+	-	+	-	-	+	-	250	89
30	5	E	BuBuBL	B	4	24	yok	24	sag	var	+	-	+	-	+	+	-	280	92
31	4	E	BuBuBL	B	3	156	yok	156	sag	var	+	-	-	-	+	+	-	280	86
32	4	E	BuBuBL	B	3	32	yok	32	sag	var	+	-	+	-	+	+	-	300	92
33	8	E	BuBuBL	B	3	22	yok	22	sag	var	+	+	-	-	+	+	-	310	85
34	4	E	BuBuBL	B	4	34	yok	34	sag	var	+	+	+	+	+	-	-	350	86
35	5	K	BuBuBL	B	4	162	yok	162	sag	var	-	-	+	-	+	-	-	30	71
36	5	E	BuBuBL	B	3	54	yok	54	sag	var	-	-	+	-	+	-	-	30	91
37	5	E	BuBuBL	B	3	77	yok	77	sag	var	-	-	+	-	-	-	-	50	77
38	11	K	BuBuBL	B	4	135	yok	135	sag	var	-	-	+	-	-	+	+	60	67
39	4	E	BuBuBL	B	1	58	yok	58	sag	var	-	-	+	-	-	-	-	80	84
40	4	E	BuBuBL	B	4	15	yok	15	lost	var	-	-	+	-	-	-	+	80	85
41	5	E	BuBuBL	B	3	50	yok	50	sag	var	-	-	+	-	+	-	-	140	82
42	8	E	BuBuBL	B	3	4	var	4	kayıp	yok	-	-	-	-	-	-	-	165	61
43	7	E	BuBuBL	B	3	1	yok	1	kayıp	yok	-	-	+	-	-	-	+	230	73
44	6	E	BuBuBL	B	3	3	yok	3	kayıp	yok	-	-	+	-	+	-	+	250	73
45	6	E	BuBuBL	B	2	2	yok	2	kayıp	var	-	-	+	-	+	+	-	280	84
46	4	E	BuBuBL	B	3	6	yok	6	kayıp	var	-	-	+	-	+	+	-	350	75
47	6	E	BuBuBL	B	3	23	yok	23	sag	var	+	-	+	-	-	-	+	210	68
48	5	E	BuBuBL	B	3	27	yok	27	sag	var	-	+	-	-	-	+	+	45	32
49	12	K	DBBHL	B	3	154	yok	154	sag	var	-	-	-	-	-	-	+	70	43
50	10	E	DBBHL	B	4	156	yok	156	sag	var	-	-	-	-	-	+	+	75	37
51	6	K	DBBHL	B	4	26	var	13	ex	var	-	-	-	-	-	-	+	90	37
52	13	E	DBBHL	B	1	40	yok	40	sag	var	-	-	-	-	+	-	+	110	38
53	9	K	DBBHL	B	4	1	yok	1	kayıp	yok	-	-	+	-	-	+	+	110	54
54	8	E	DBBHL	B	3	101	yok	101	sag	var	-	-	-	-	+	+	+	210	31
55	5	E	DBBHL	B	3	109	yok	109	sag	var	+	+	-	-	-	-	+	80	39
56	10	K	DBBHL	B	4	67	var	23	ex	yok	+	-	-	-	+	+	-	80	25
57	15	E	DBBHL	B	3	110	yok	110	sag	var	+	+	-	-	-	-	+	160	33
58	4	K	DBBHL	B	3	164	yok	164	sag	var	+	+	-	-	+	-	+	220	19
59	7	E	PTHL	T	3	139	var	102	relaps	var	-	-	-	-	+	+	+	50	33
60	8	E	PTHL	T	3	78	yok	78	sag	var	-	-	-	-	-	+	-	55	59
61	4	E	PTHL	T	3	8	yok	8	sag	yok	-	-	-	-	-	-	-	200	47
62	14	E	ABHL	T	2	21	yok	21	kayıp	var	-	-	-	-	-	+	-	20	42
63	6	E	ABHL	T	4	4	yok	4	kayıp	yok	-	-	-	-	+	+	+	25	28

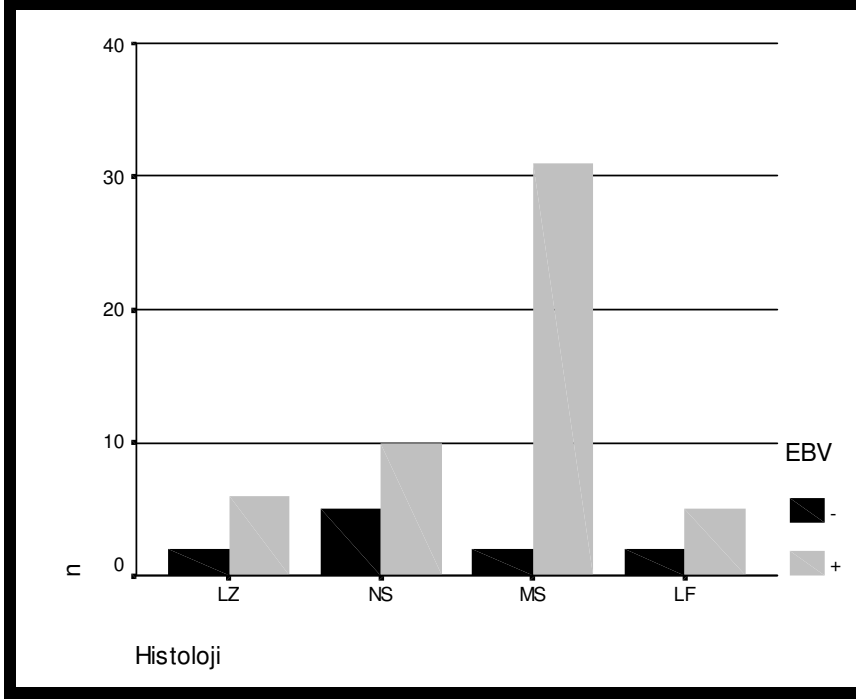
Olgu No	yaş	Cinsiyet	Histoloji	Fenotip	Evre	izlem Ay	Olay	EFS Ay	Prognoz	Tedavi Yanıt	EBV	Fas	Cmyc	P53	Bax	Survivin	Bcl-2	Apoptoz	Prolifer. index
64	1	K	ABHL	T	3	120	yok	120	sag	var	-	-	-	-	-	-	+	30	47
65	5	E	ABHL	T	4	39	yok	39	sag	var	-	+	-	+	+	-	-	45	25
66	6	K	ABHL	T	4	81	yok	81	sag	var	-	-	-	-	+	-	-	85	36
67	17	K	ABHL	T	4	20	var	14	ex	yok	-	-	-	-	-	-	+	85	31
68	10	K	ABHL	T	3	99	yok	99	sag	var	-	+	-	+	-	-	+	100	35
69	5	K	ABHL	T	3	14	var	8	ex	yok	-	-	-	-	+	+	+	160	41
70	13	E	ABHL	T	4	17	var	11	sag	var	+	-	-	-	-	-	-	30	28

Tablo 5: Hodgkin Lenfomada Apoptoz ilişkili Faktörlerin EBV İle İlişkisi

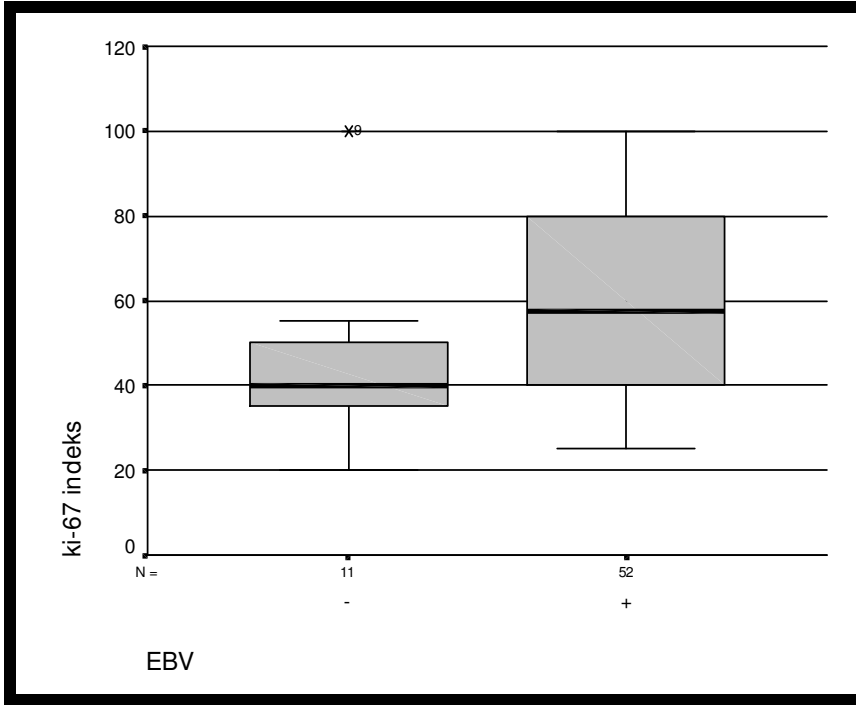
EBER	-(n)	+(n)	p
Fas -	7	4	0,170
Fas +	22	30	
P53 -	9	2	0,209
P53+	31	19	
Bax-	1	10	0,163
Bax+	15	37	
Bcl-2 -	4	7	0,201
Bcl-2 +	29	23	
Survivin-	5	6	0,297
Survivin+	31	21	
c-myc-	10	1	0,163
c-myc+	37	15	

Tablo 6: Non-Hodgkin Lenfomada Apoptoz ilişkili faktörlerin EBV ile ilişkisi

EBER	-(n)	+(n)	p
Fas -	48	9	0.0001
Fas +	4	9	
P53 -	49	15	0.158
P53+	3	3	
Bax-	34	8	0.121
Bax+	18	10	
Bcl-2 -	22	13	0.030
Bcl-2 +	30	5	
Survivin-	31	9	0.481
Survivin+	21	9	
c-myc-	30	22	0,242
c-myc+	8	10	

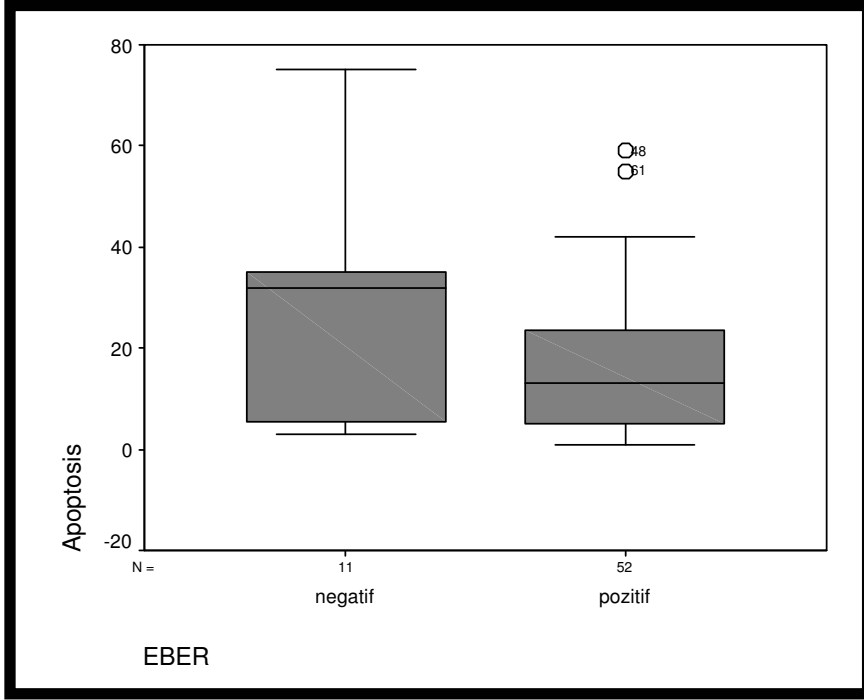


Şekil 1: HL olgularının EBV ve histolojik tiplere göre dağılımı (MSHL olguları seride en yüksek ve en çok EBV pozitifliği göstermektedir.).

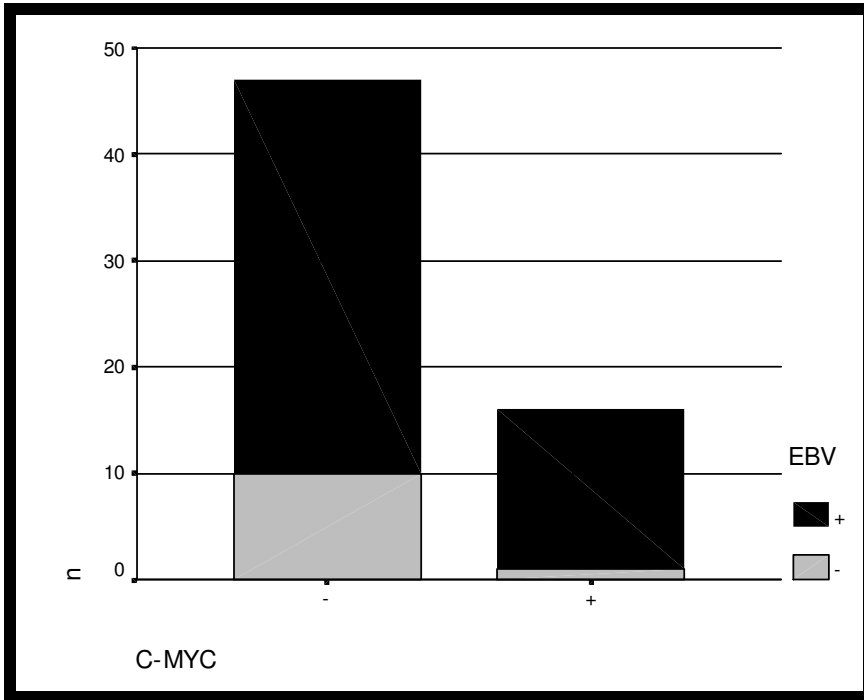


Şekil 2: HL olgularında Ki-67 indeksinin (Pİ) EBV'e göre Karşılaştırılması (EBV pozitifliği yüksek olup bu olgularda Pİ daha yüksektir).

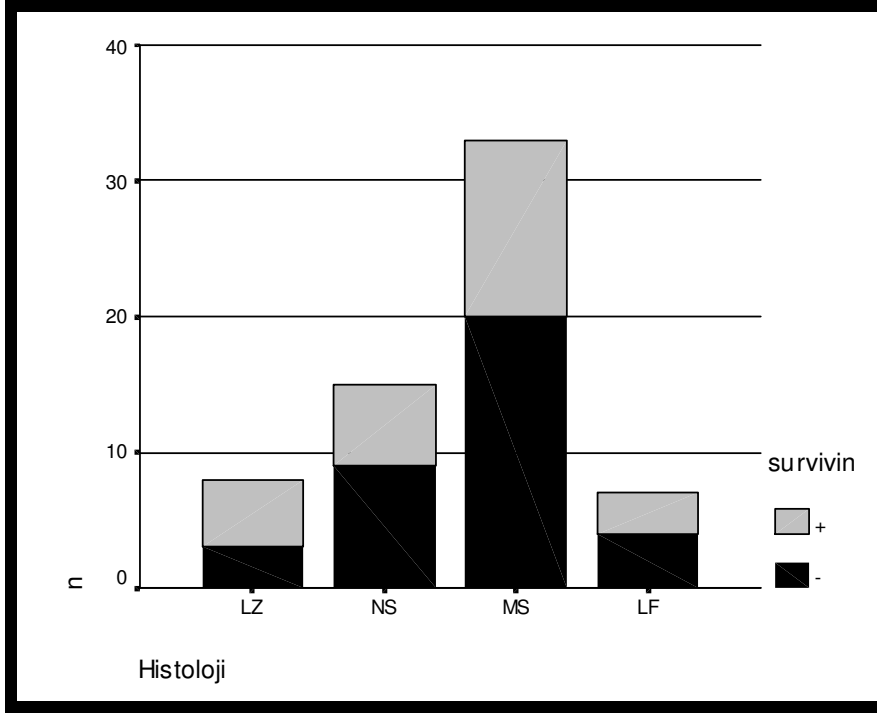




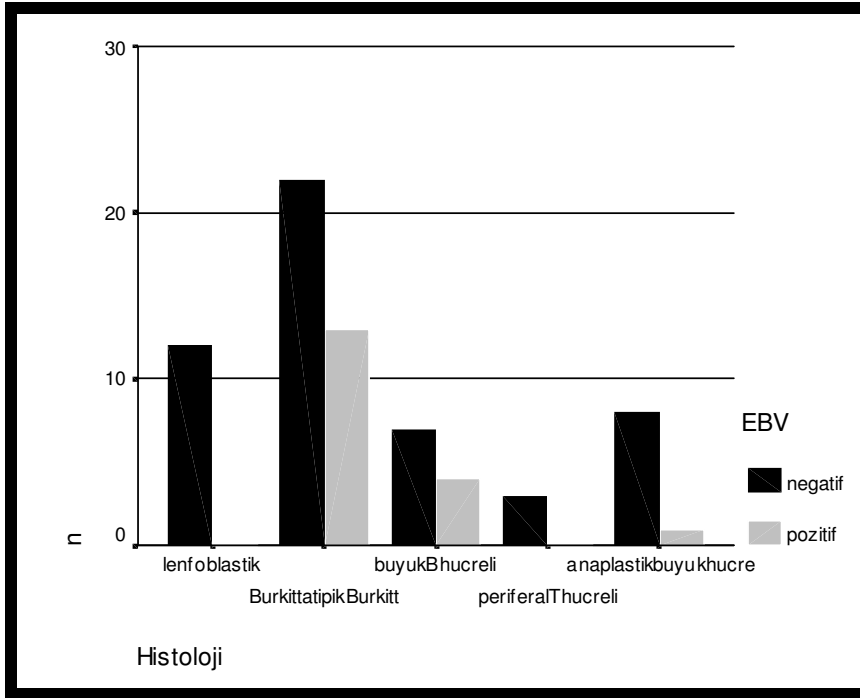
Şekil 3: HL olgularında Aİ'in EBV'e göre karşılaştırılması (EBV pozitifse Aİ düşüktür ).



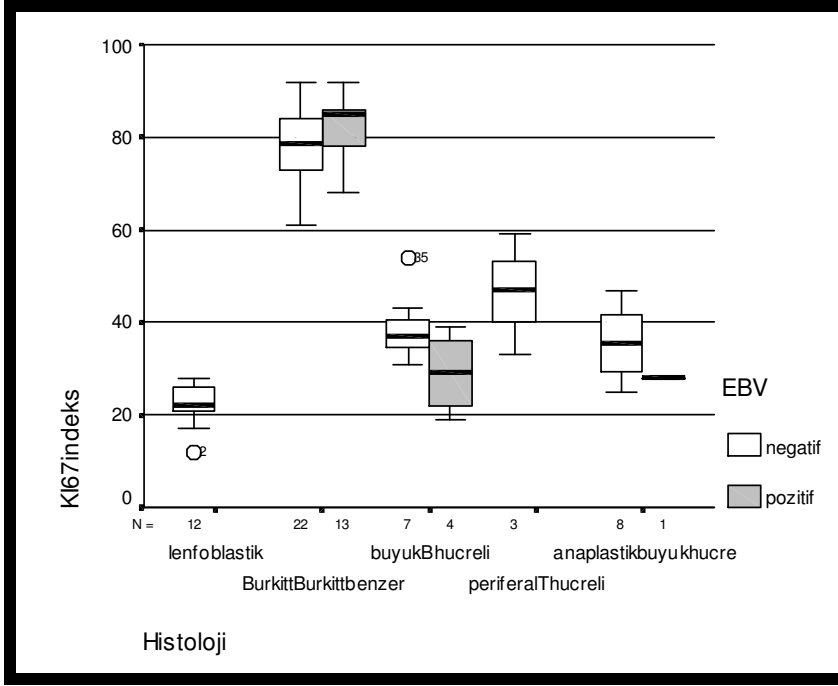
Şekil 4: HL olgularında c-myc Ekspresyonunun EBV'e Göre Karşılaştırılması (c-myc pozitifliği düşük olup EBV ilişkisizdir).



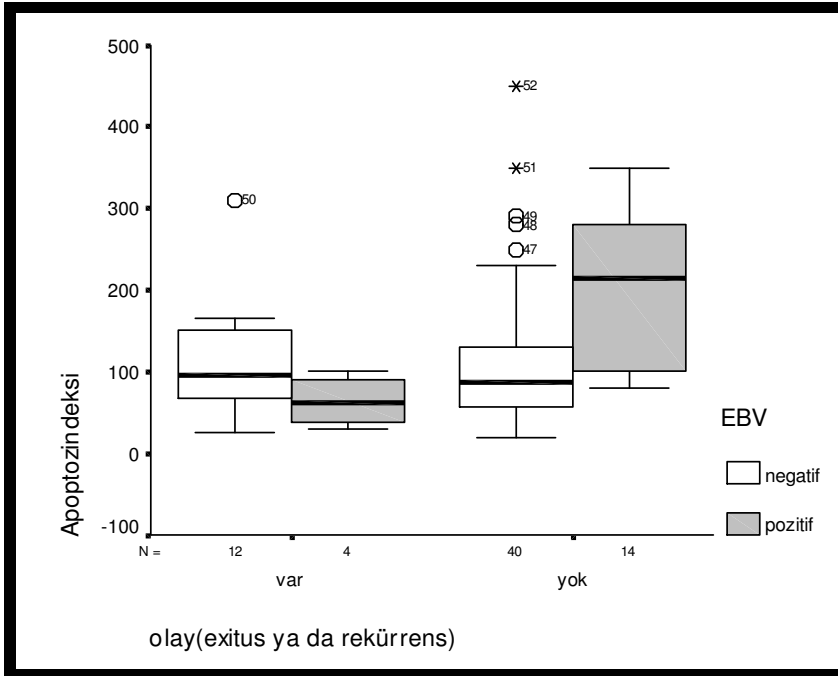
Şekil 5: HL Olgularında Survivin Ekspresyonunun Histolojik Tiplere Göre Karşılaştırılması



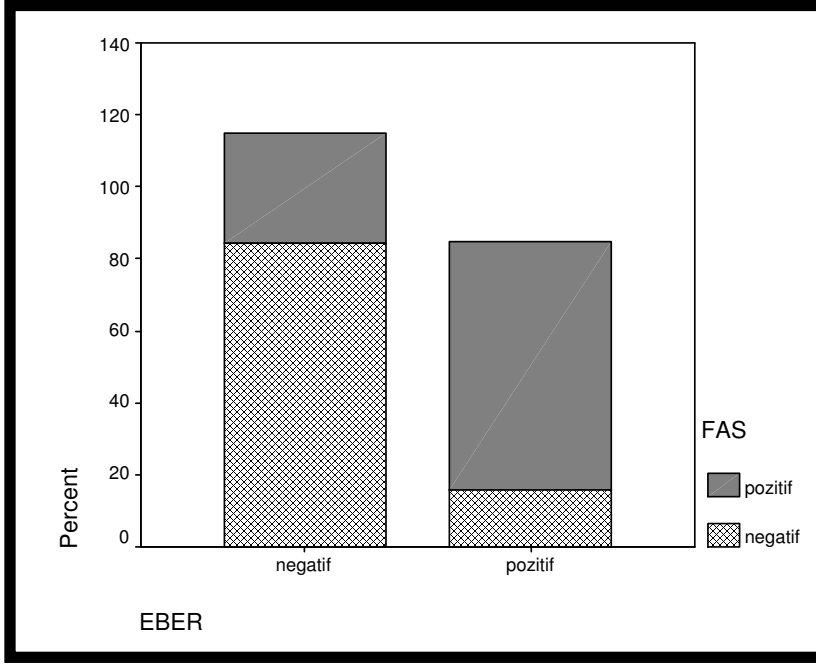
Şekil 6: NonHodgkin Lenfoma Olgularının EBV ve Histolojik Tiplere Göre Dağılımı (BuBuBL en sık olup EBV pozitifliği BuBuBL ve BBHL'da sıktır).



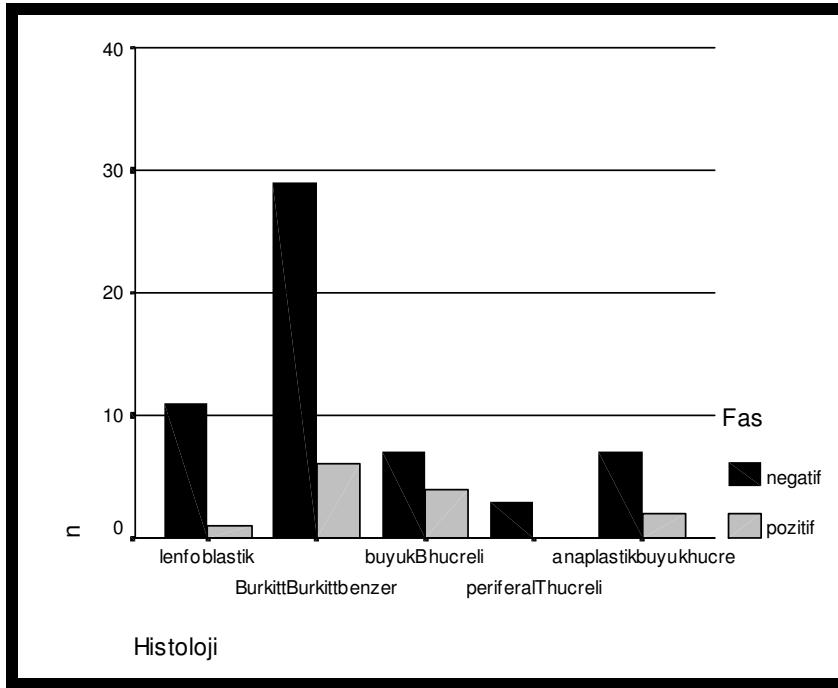
Şekil 7: NHL'da Ki 67 indeksinin (PI) Histolojik tip ve EBV'ye göre Dağılımı (BuBuBL'da PI en yüksek olup EBV pozitif ve negatiflerde anlamlı fark yoktur).



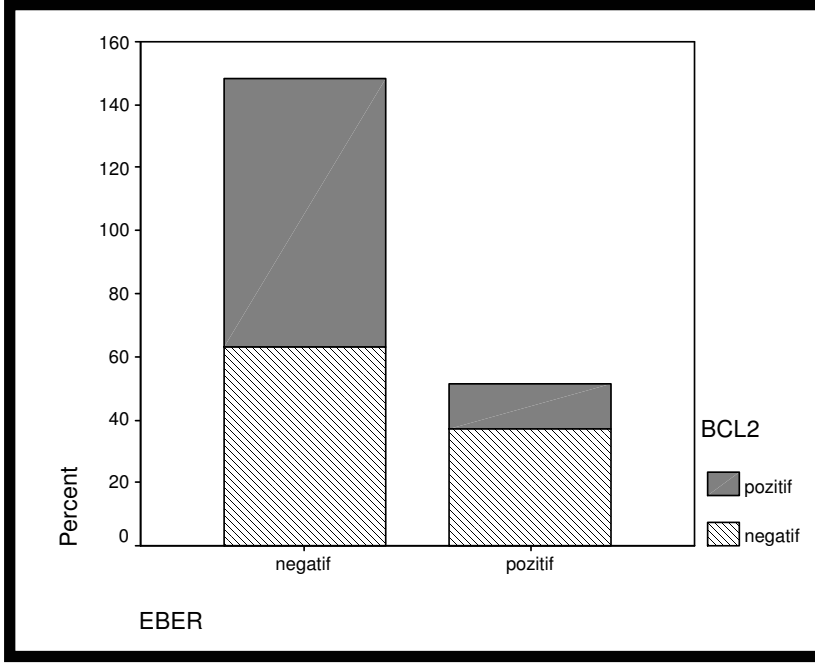
Şekil 8: NHL'da Apoptoz İndeksinin EBV'ye Göre Dağılımı (Olay yokluğunda ve EBV pozitifliğinde AI daha yüksektir).



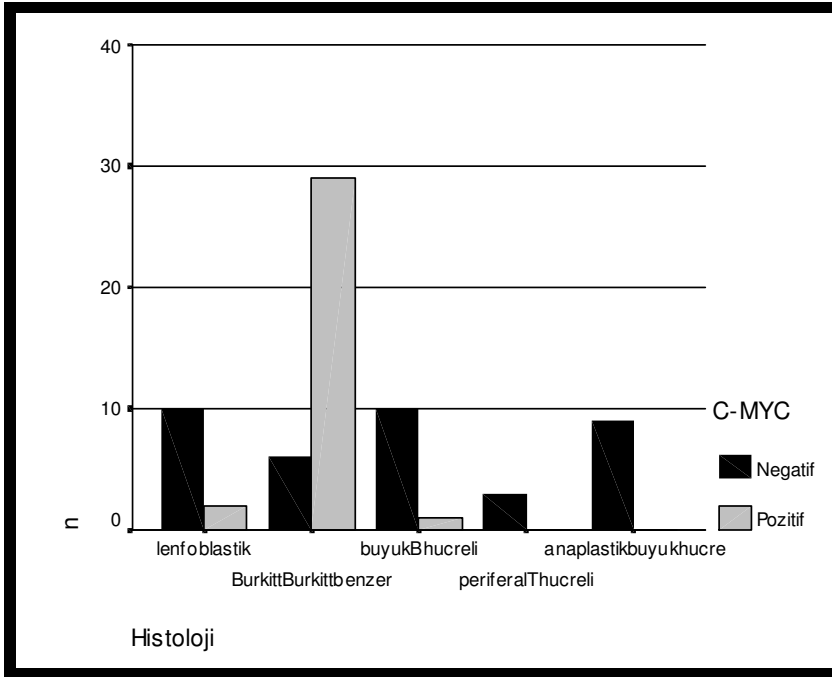
Şekil 9: NHL'da fas Ekspresyonunun EBV'ye göre Dağılımı (EBV pozitif olgularda fas ekspresyonu yüksektir).



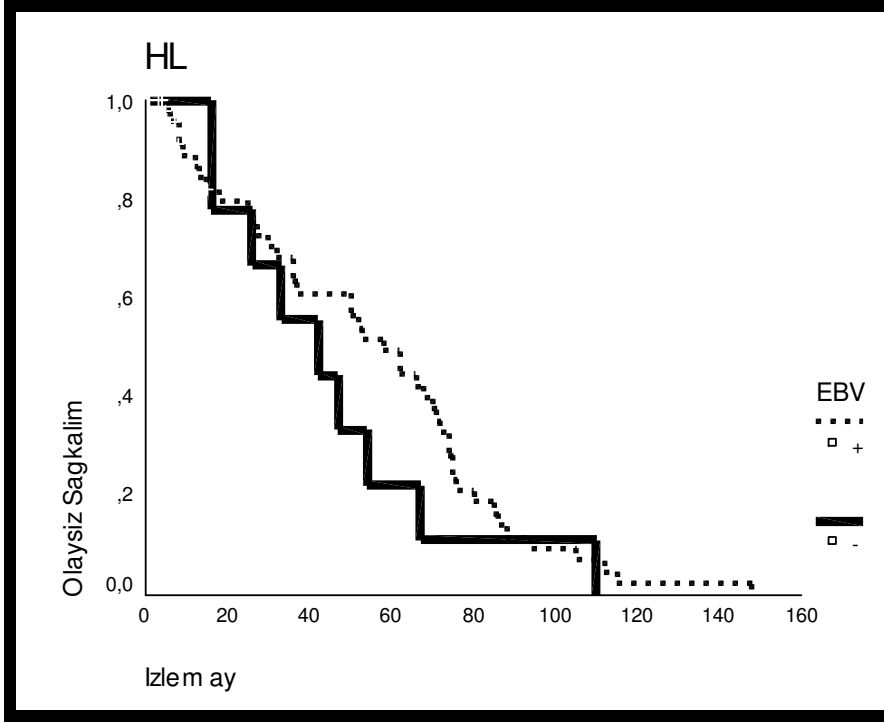
Şekil 10: NHL'da Fas ekspresyonunun Histolojik Tiplere göre Dağılımı



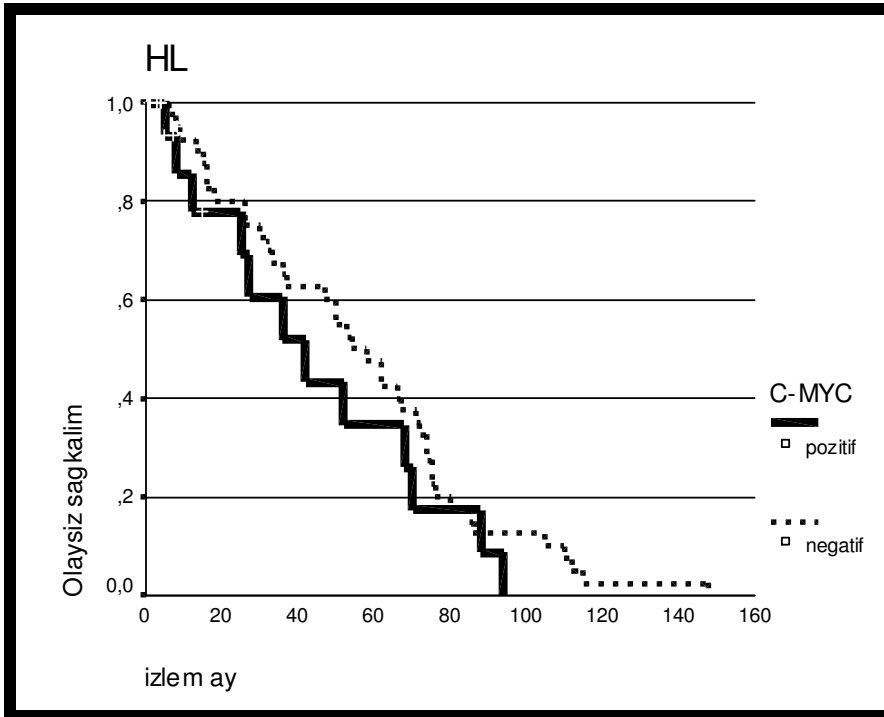
Şekil 11: NHL’da Bcl-2 Ekspresyonunun EBV’ye göre Dağılımı (EBV pozitif olgularda bcl-2 ekspresyonu düşüktür).



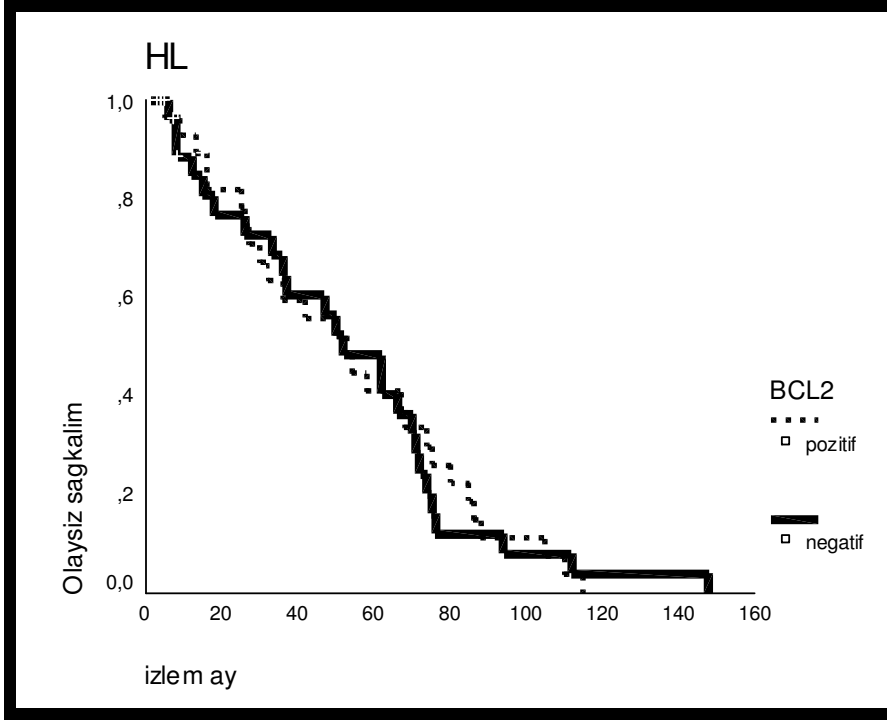
Şekil 12: NHL’da c-myc Ekspresyonunun Histolojik Tiplere Göre Dağılımı (BuBuBL’da en yüksek olup EBV ilişkisizdir).



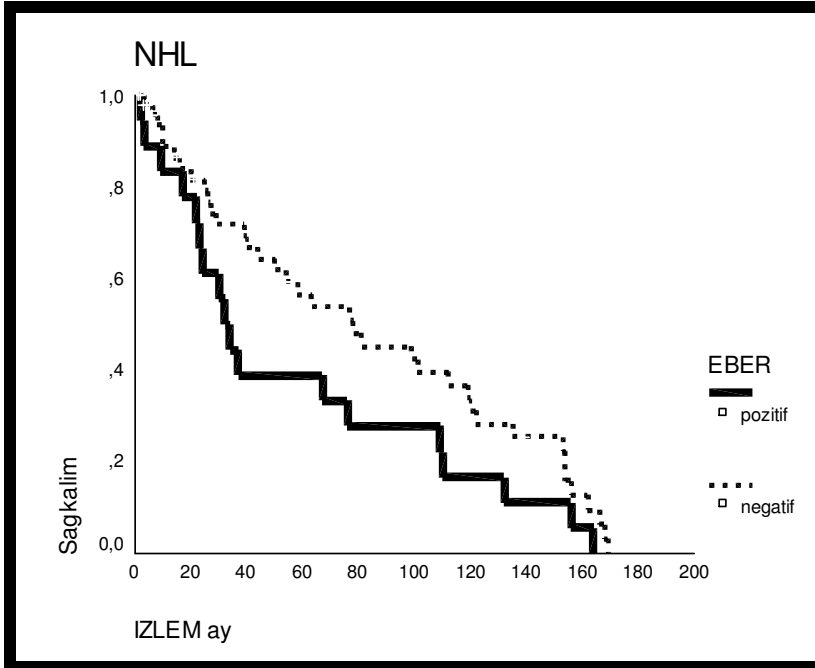
Şekil 13: Hodgkin Lenfoma Olgularında EBV'in Olaysız Sağkalım ile İlişkisi (LogRank  $p>0.05$ )



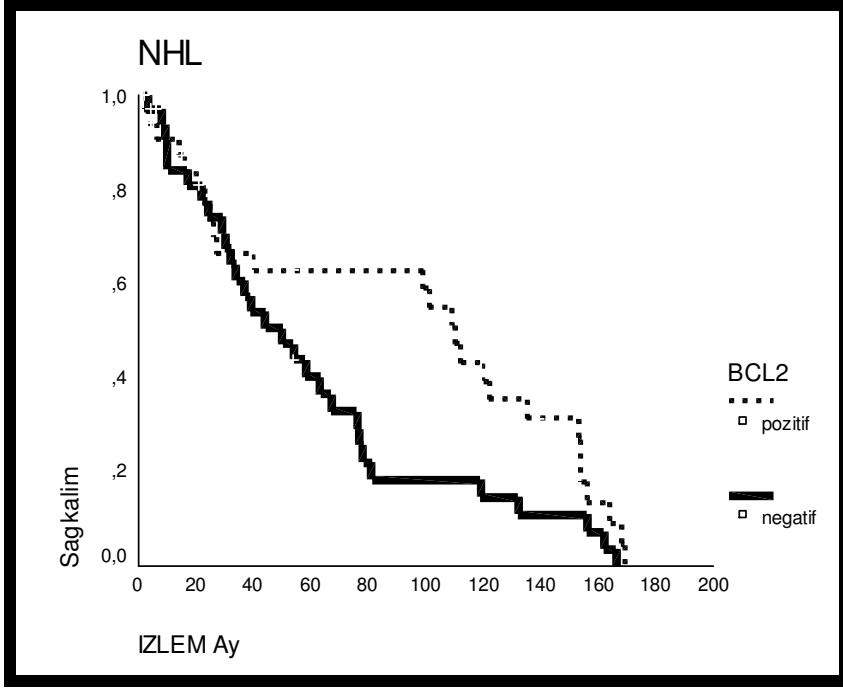
Şekil 14: HL Olgularında C-myc'in Olaysız Sağkalım ile İlişkisi (LogRank  $p>0.05$ )



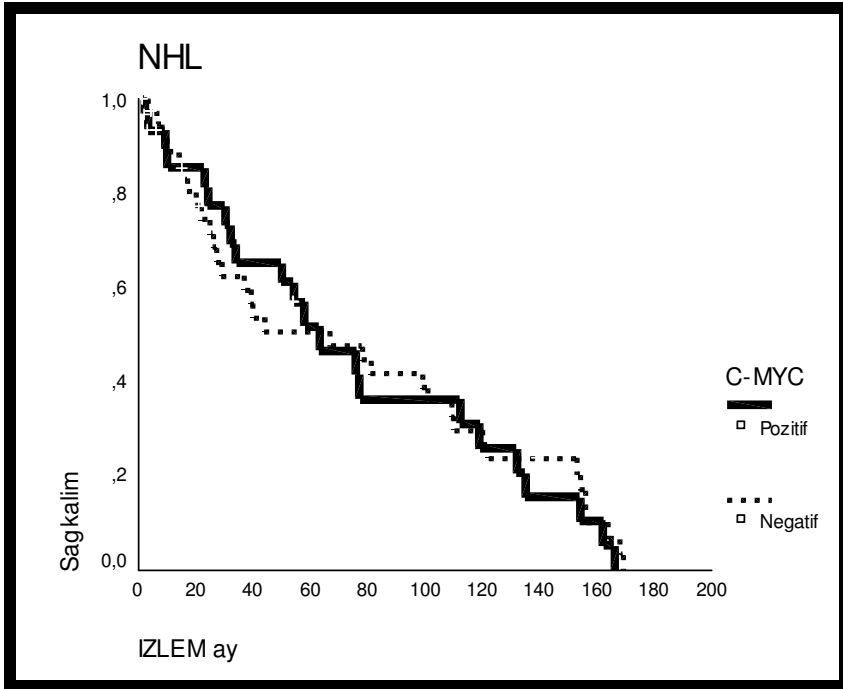
Şekil 15: HL Olgularında Bcl-2'in Olaysız Sağkalım ile İlişkisi (LogRank  $p>0.05$ )



Şekil 16: NHL'da EBV'nin Sağkalıma Etkisi (LogRank  $p>0.05$ )

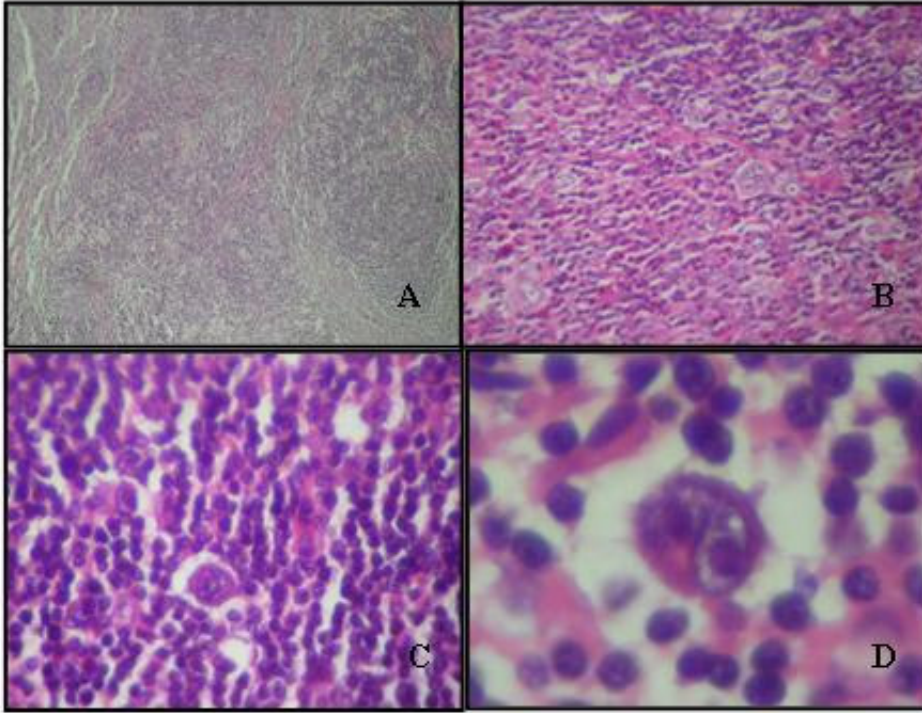


Şekil 17: NHL’da Bcl-2 Ekspresyonunun Sağkalıma Etkisi(LogRank  $p>0.05$ )

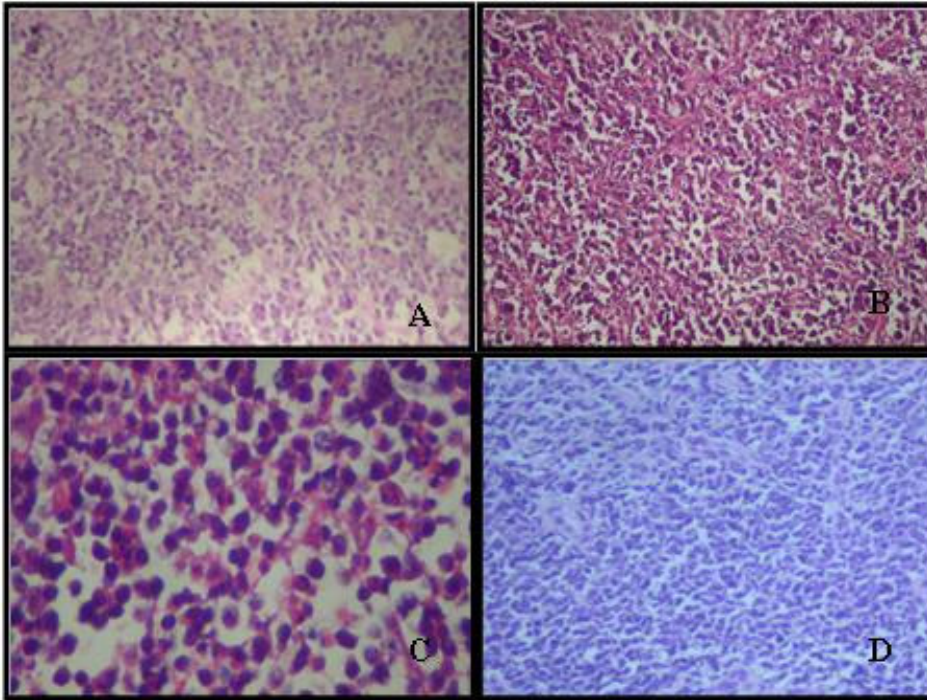


Şekil 18: NHL’da c-myc Ekspresyonunun Sağkalıma Etkisi(LogRank  $p>0.05$ )

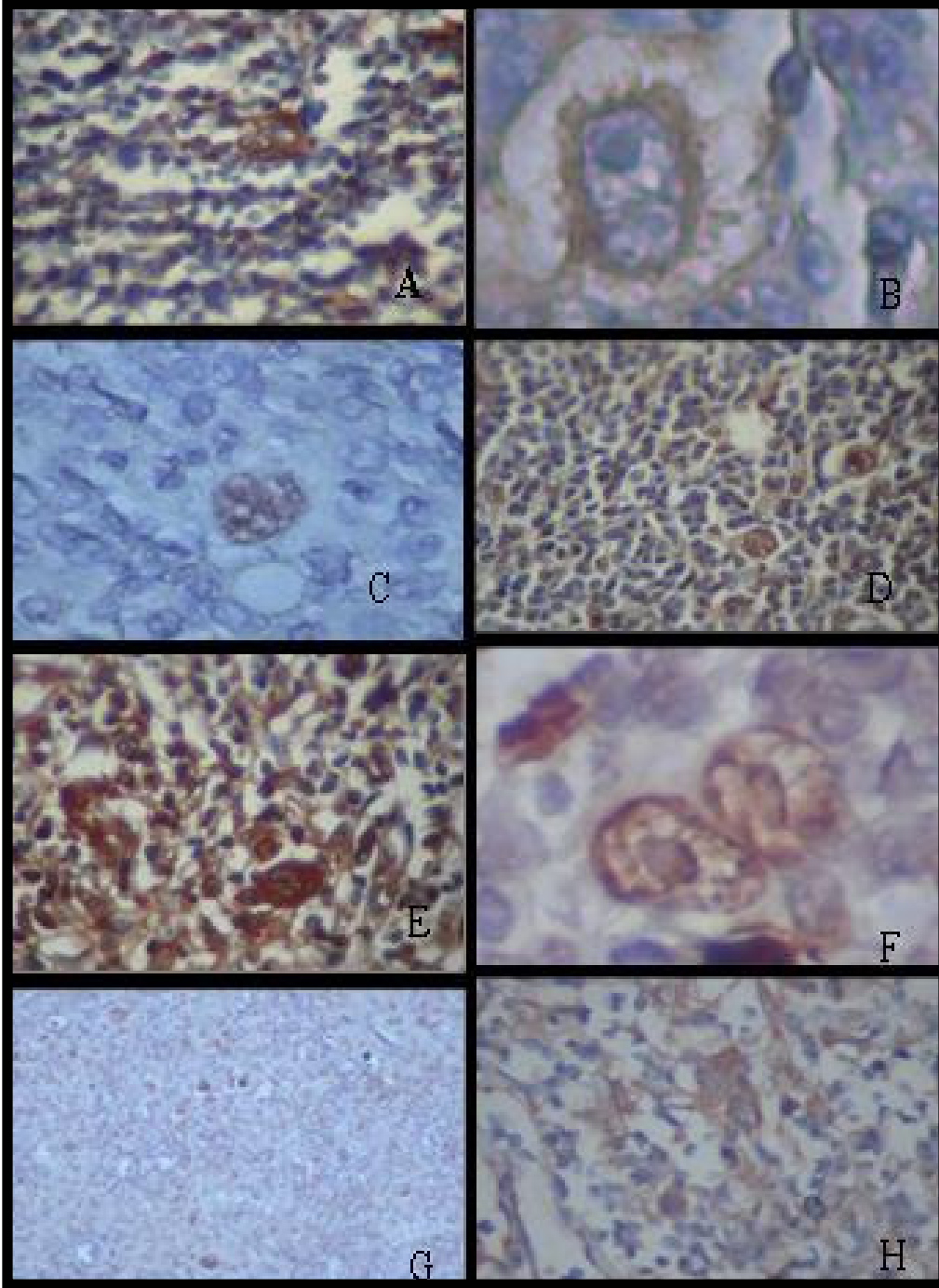




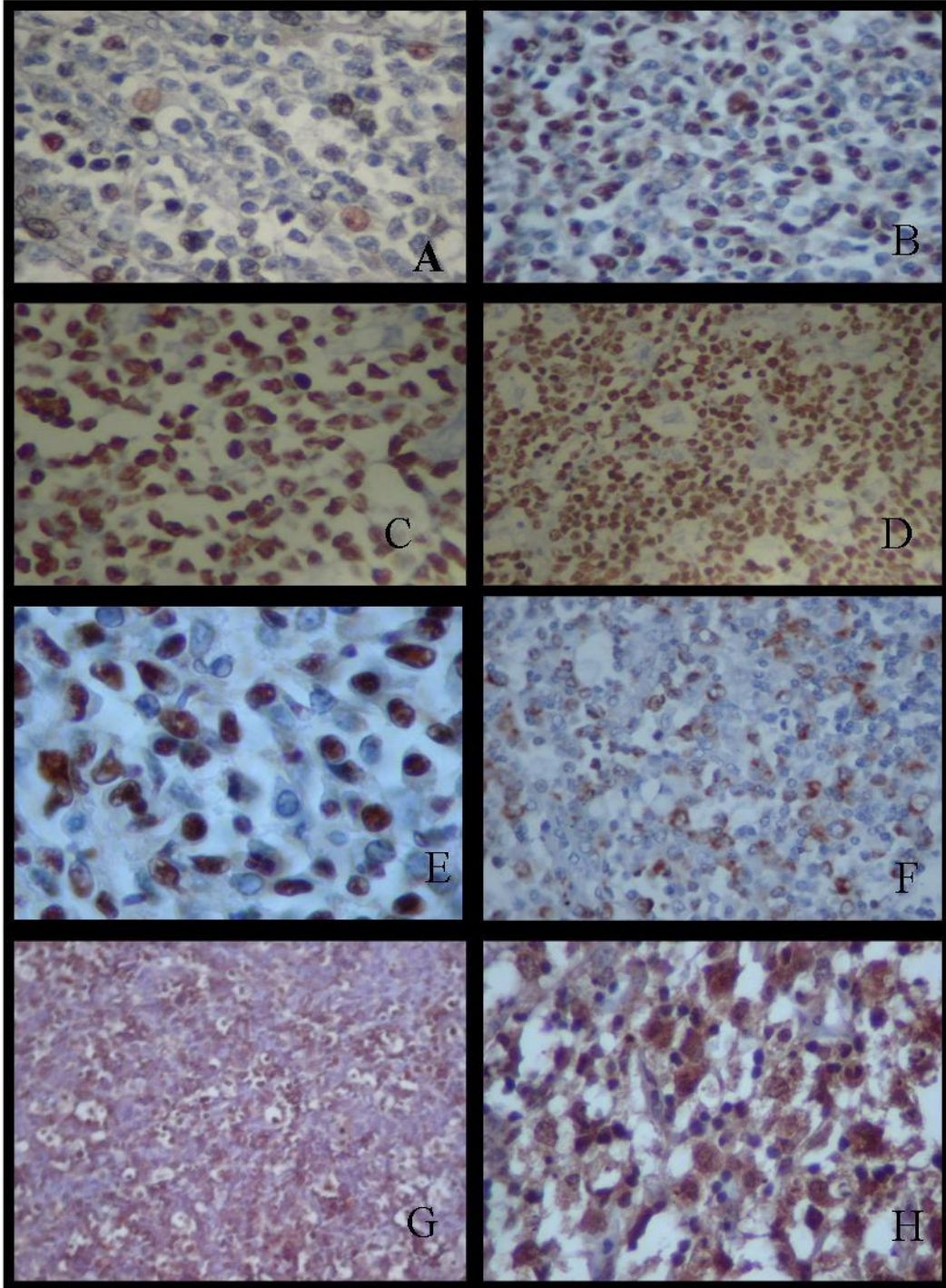
Resim 1: Hodgkin Lenfoma, A: nodüler sklerozan tip, B: Mikst sellüler tip, C: Lenfosit zengin tip, D: Reed Sternberg hücresi (Hematoksilen Eozin x40, x100, x200, x400).



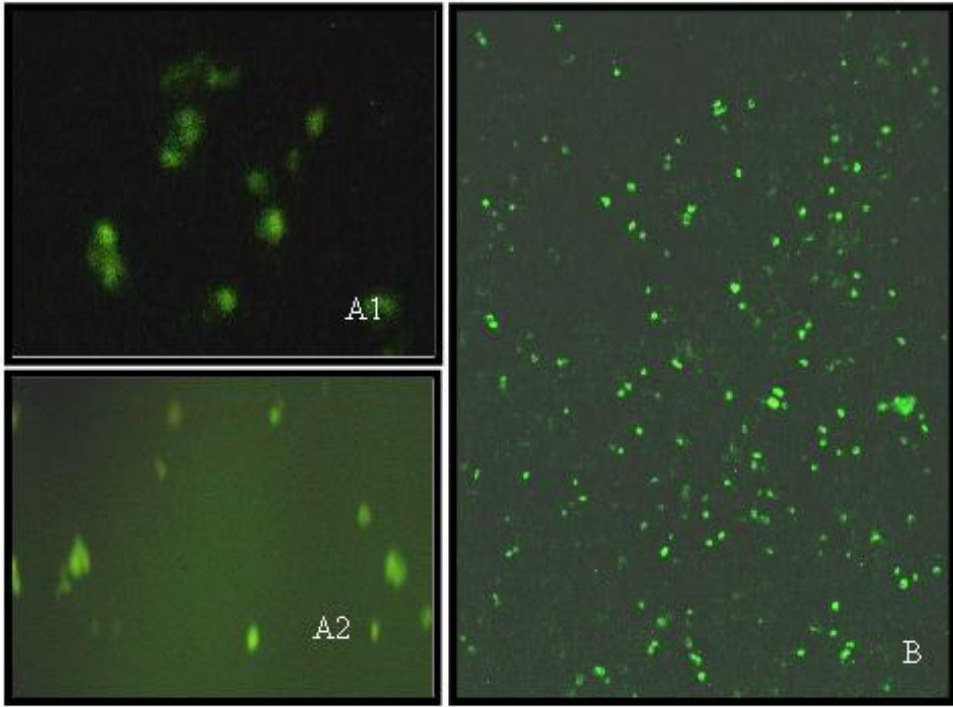
Resim 2: NonHodgkin Lenfoma, A: Burkitt lenfoma, B: Anaplastik Büyük Hücreli Lenfoma C:Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma, D: Lenfoblastik Lenfoma (Hematoksilen Eozin x100).



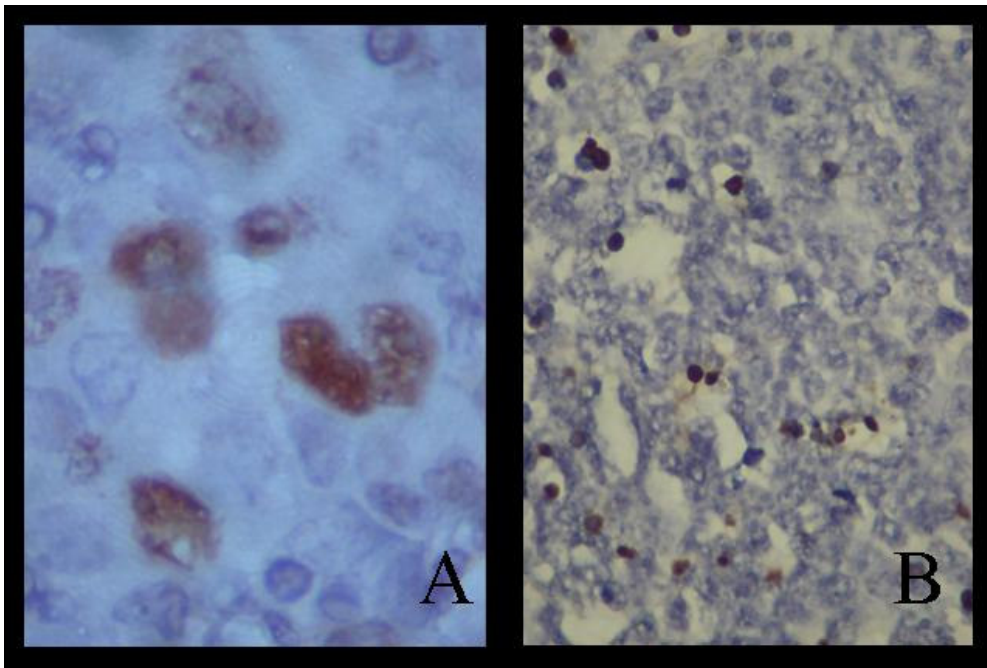
Resim 3: Hodgkin Lenfomada Reed Sternberg Hücrelerinde İmmunhistokimyasal Boyanma, A: LMP-1, B: Bcl-2,C: p53, D: Ki-67, E: C-myc, F: Bax, G:Survivin, H:Fas ekspresyonu



Resim 4: NonHodgkin Lenfomada İmmunhistokimyasal Boyanma, A: LMP-1, B: p53, C:Bcl-2, D: Ki-67, E: C-myc, F: Bax, G:Survivin, H:Fas ekspresyonu (DABx40-200)



Resim 5: Floresan in situ Hibridizasyon ile EBER pozitifliği, A1,A2: Hodgkin Lenfoma, B: Burkitt Lenfoma



Resim 6: TUNEL yönteminde Apoptotik Hücreler,A:HL, B:NHL

## **8. TARTIŞMA**

Bu çalışmada 63 pediatrik HL ve 70 pediatrik NHL olgularında LMP-1 ve EBER yöntemleri ile EBV varlığı araştırılmış ve Ki-67 ile saptanmış Pİ, konvansiyonel yöntem ve TUNEL yöntemi ile saptanmış Aİ, İHKsal yöntemle saptanmış bcl-2, bax, survivin, p53, fas, c-myc gibi apoptoz ilişkili faktörlerin prognostik önemi ve EBV ile ilişkisi araştırılmıştır. Ayrıca tüm bu parametreler olguların yaş, cinsiyet, evre, kemoterapiye yanıt, tümörün histolojik tipi, rekürrens olup olmadığı gibi klinikopatolojik özelliklerle istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Olgularımızda her iki seride sağkalım süreleri uzun ve sağkalım yüzdeleri yüksektir. Günümüzde HL ve NHL olgularındaki güncel multimodal tedavilerle yüksek tedavi edilebilirlik oranı sözkonusudur. Bu çalışmada, çocukluk çağı lenfomalarında tedavideki başarı oranının yüksekliği literatürle uyumlu olarak bizim serimizde de izlenmektedir.

HL olgularımızda evre olarak hastalar her dört evreye de dağılmıştır. Bu oranlar literatürdeki benzer seriler ile uyumludur. Cinsiyet dağılımı E:K=2:1 (42:21) oranında olup yine literatürle uyumludur.

EBV enfeksiyöz mononükleoza yol açan insan herpes virusudur. Bazı nasofarinks karsinomlarında, BuBuBL'da ve immunbaskılanma varlığında gözlenen lenfoproliferatif hastalıklarda etiyolojik rol oynadığı düşünülmekle birlikte hala tek başına etiyolojik faktör olduğuna dair kanıtlar olmaması EBV ve karsinogenez ilişkisi ile ilgili çalışmaların artmasına neden olmaktadır. (1-6). PTHL, oral hairy leukoplakia, natural killer hücreli büyük lenfositik lösemi, anjiosentrik lenfoma'da değişik oranlarda ve yaklaşık %50 HL'da EBV varlığı saptanmıştır (7). Ancak HL'da görülme yüzdeleri çok değişiklik göstermektedir. DNA hibridizasyon çalışmaları ile lenfoproliferatif hastalığı olan olguların doku biopsilerinde EBV'nin latent (sirküler, episomal) ve replikatif (lineer) formları saptanabilir. Replikatif EBV asiklovir sağaltımına yanıt verir, latent EBV vermez. Arşiv dokularda ve periferik kan mononükleer hücrelerde PCR ile EBV genomu saptanabilir. Parafin bloklardan immunhistokimyasal yöntemle EBV'nin BZLF1 proteininin bakılması virüs partikülü üreten ya da üretmeye başlayan hücreleri gösterir. Çünkü bu ürün BZLF1 geninin kodladığı orta-erken transkripsiyon aktivatörü bir proteindir. Primer B lenfositler EBV ile enfekte olduktan sonra EBNA (EBV-determined nuclear antigens) ortaya çıkar. Önce EBNA2 ortaya çıkar. Bu spesifik viral ve hücrel genlerin transkripsiyon aktivatörüdür. Sonra EBNA-leader protein ve diğer EBNA'lar eksprese olur. Bunları latent membran proteinler (LMP) ve "EBV-encoded

small nonpolyadenylated RNAs” (EBER) izler. EBV ilişkisini saptama da altın standart olarak immunhistokimyasal LMP1 ve FISH ile EBV- EBER bakılması önerilmektedir.

LMP-1 birçok hücre tipinde hücrel gen ekspresyonunu artırarak onkogen aktivitesi gösterir. Bcl-2’ yi uyararak apoptozu önler. LMP-1 tümör nekroz faktör (TNF) reseptörü ailesinin viral bir analogudur. TNF reseptör ilişkili faktöre bağlanıp, nükleer faktör B’ye sinyal iletimine yol açar. LMP-1’in karboksil ucu B hücre transformasyonunda önemlidir. CD40 sinyal yolağını taklit ederek B hücre aktivasyonuna yol açar. Karboksil ucunda delesyon olan formlarında tümör geliştirme potansiyelinin fazla olduğu düşünülmektedir (107).

EBV lenfoma ilişkisi bölgesel ve ülkesel düzeyde ayrı ayrı çalışılmaktadır. Çünkü hastalığın endemik, nonendemik ve immünyetmezlik ilişkili olup olmadığının saptanmasında önemlidir (12-18). Ülkemizde bu konuda yurtiçi, ya da yurtdışı bağlantılı az sayıda serolojik, immunhistokimyasal, FISH ya da PCR bazlı çalışmalar vardır (19-26). Bu çalışmalarda EBV ilişkisi HL’da % 43-55, BuBuBL’da %100 bulunmuştur. Kanselerde etiolojiyi ortaya koyma yönündeki çalışmalar prognozu saptamada, etkeni ortadan kaldırmaya çalışma, etiopatogenezi anlamaya çalışmada çok önemlidir. Yılmaz ve arkadaşları Türkiye’de Güneydoğu Bölgesini kapsayan 52 olguluk pediatrik HL serilerinde LMP-1 pozitifliğini % 61.5 oranında saptamışlardır (27). Ayrıca serilerinde mikst sellüler histolojik tip en sık görülmüştür. Bizim serimizde de mikst sellüler tip en fazladır. Bizim serimizde pediatrik HL da EBV birlikteliğinin Güneydoğudan bile daha fazla görülmesinin Hastanemizin hizmet verdiği İzmir yanısıra Türkiye’nin birçok yerinden de gelen sosyoekonomik düzey düşük hasta popülasyonu ile ilişkilendirebiliriz. Ancak İzmir’den daha az sayıda olgulu yaş ayrımı gözetmeyen bir çalışmada EBER HL’da %50, NHL’da %23.8 oranında pozitif saptanmıştır (28). Bir çok çalışma da mikst sellüler olgularda nodüler sklerozan olgulara göre daha fazla EBV ilişkisi saptanmıştır (2). Bizim serimizde de tüm HL’larda % 82,5 pozitiflik varken bu pozitiflik MS tipte %93,9 oranındadır.

HL serimizde tümör hücrelerinde EBV varlığı ile sağkalım ilişkisi saptanmamıştır. Keegan ve arkadaşları (108) çocukluk çağında HL’da EBV birlikteliğinin daha uzun sağ kalımla ilişkili olduğunu 922 olguluk serilerinde saptamışlardır. Bizim serimizde prognostik ilişki saptanmaması kötü prognozlu olgu sayımızın azlığından kaynaklanan istatistiksel bir sonuç olabilir.

Neoplastik süreçte tümör hücrelerinin akümüasyonu yalnızca proliferasyonla değil bununla birlikte hücre ölüm oranı ile de belirlenir. Bu nedenle Pİ ile birlikte apoptoz ilişkili faktörler

ve Aİ de birlikte değerlendirilmelidir. HL serimizde Ki-67 ile saptanan ve HRS hücre oranı sayılıp yüzdeye çevrilerek değerlendirilen Pİ ortalaması %57,83'tür. HRS hücrelerindeki bu oldukça yüksek oran tiplere göre irdelendiğinde nodüler sklerozan histolojik tipte daha düşük saptanmıştır. Apoptoza giden mumifiye hücrelerde Ki-67 skorunda düşüklük beklenen bir bulgudur. Yine nodüler sklerozan histolojik tipte AI yüksektir. Buna paralel olarak bax ekspresyonunun nodüler sklerozan histolojik tipte diğer tiplere göre en yüksek olması da bulgularımızla koreledir. Serimizde HL'da %47.6 oranında saptanan bcl-2, %42.9 oranında saptanan survivin, %54 oranında saptanan fas, %33.3 oranında saptanan p53, %25.4 oranında saptanan c-myc histolojik alt tiplerde istatistiksel bir farklılık göstermemiştir. %74.6 oranında saptanan bax lenfositte zengin olguların tümünde, NSHL olguların %80' inde pozitif bulunmuştur. Bu durum bu histolojik türlerde HRS hücrelerinin azlığı ya da mumifiye olması ile ilişkilendirilebilir. Ancak Rassidakis ve arkadaşları 260 olguluk HL serilerinde bax ekspresyonunu %94 oranında gözlemişler ancak olaysız sağ kalımla ilişki saptamamışlardır (108). Ekspresyon oranı bizim serimizden daha yüksektir. Ancak serilerinde mikst sellüler histolojik tipte ekspresyon oranı nodüler sklerozan tipten daha fazladır. Bizim çalışmamızda da bax prognoz, klinik ve diğer laboratuvar özelliklerle ilişki göstermemiştir. Çalışmamıza dahil edilen tüm olgular tedavi öncesi olduğu için kemoterapi ilişkili apoptoz sorgulanmamıştır.

Bir tümör süpresör gen protein ürünü olan p53 birçok fonksiyonu ile beraber apoptozu düzenleyen genlerin aktivitesini düzenleyen bir faktör olarak da görev yapmaktadır. Mutant p53 bcl-2 gibi davranıp apoptozu inhibe eder. Birçok tümörde p53 pozitifliği yüksek histolojik derece, evre, tümör progresyonu, yüksek proliferasyon ile ilişkili bulunmuştur (109). Nazofarinks karsinomunda p53 gen mutasyonu saptanmasa da p53 ekspresyonu olur. Bu durum p53'ün akümülyasyonunda EBV'nin rolü olabileceğini düşündürmüştür. Kim ve ark. 66 olguluk klasik HL serilerinde EBV varlığını %53, p53 ekspresyonunu %81.5 oranında saptamışlardır. Ancak prognostik araştırma yapmamışlardır (96). Spector ve ark. 83 olguluk serilerinde p53 ve LMP-1 ekspresyonunu sağ kalımla ilişkisiz bulmuşlardır (110). Arjantin'den bir çalışmada p53 ekspresyonu %81 oranında yüksek saptanmıştır ve sağ kalımla ilişkisizdir (111).

NHL olgularımız evre olarak evre III ve IV 'de yığılma göstermektedirler. Diffüz yüksek dereceli lenfoma gurubunda ileri evrede oluşu literatürle uyumludur. Cinsiyet dağılımı E:K=1,92:1 (46:24) olarak saptanmıştır. Pediatrik NHL olgularımızı histolojik tiplere göre

irdelediğimizde LBL ve PTHL olgularının hiçbirinde EBV ilişkisi saptanmazken; ABHL'da yalnızca bir olguda EBV pozitifdir. Bunun yanında B hücreli lenfomalarda (BuBuBL ve DBBHL gurubunda %63 oranında EBER pozitifliği izlenmiştir. Bu bulgular literatürle uyumlu olup neoplastik süreçte viral onkogenin EBV latent enfeksiyonunun B lenfositler üzerinden etkisini desteklemektedir. T-hücre ilişkili neoplazilerde EBV virüs birlikteliği % 5-50 oranında bildirilmektedir. Etiyolojik rolü var mı? yoksa tümöre eşlik mi ediyor tartışması güncel olup transforme olmuş T hücrelerine *growth/survival* avantajı kazandırması şeklinde yorumlanmaktadır. Sitotoksik fenotiple sık birlikteliği (Nazal NK hücreli lenfoma gibi) virüs spesifik sitotoksik T lenfositlerin EBV enfekte hücreleri öldürme aşamalarında eoplastik gelişme olabileceğini düşündürmektedir. Sitotoksik T lenfositin EBV enfekte hücreyi tanımada ortaya çıkan bir azalma virüs antijen prezentasyon mekanizmasını bozuyor olabilir. Bulgularımız ALK pozitif T hücreli ABHL'da EBV'nin patogeneze katılmadığını desteklemektedir.

Literatürde yüksek dereceli lenfomalarda Ki-67 değeri %25'in üzerinde saptanmıştır. Bazı lenf düğümlerinde lenfoma alanı yanısıra normal lenfoid alanlar kalabileceği için doku üzerinde çalışılması ve proliferasyon aktivitesi değerlendirilen bölgenin gözlenebilir olması İHK yöntemi için çok önemli bir avantajdır. Ki-67 proliferasyon indeksi NHL serimizde LBL gurubunda en düşük iken, bunu sırasıyla ABHL, DBBHL, PTHL ve en yüksek oranla BuBuBL izlemektedir.

C-myc ekspresyonu %83 oranla en sık BuBuBL histolojik alt grupta gözlenmiştir. Diğer 35 olgunun yalnızca 3'ünde c-myc pozitifliği izlenmiştir. C-myc rearanjman olarak çalışıldığında Burkitt lenfomaya spesifik bulunmaktadır (112). Bulgularımız literatürle uyumlu olup İHK ile c-myc araştırılması histolojik tip için ayırıcı tanıyı desteklemekle birlikte %100 ayırım sağlamamaktadır. Bu çalışmanın amacı doğrultusunda araştırılan c-myc'in EBV ile ve prognoz ile ilişkisi saptanmamıştır. Pagnano ve ark. NHL serilerinde c-myc ekspresyonunu %76,5 oranında saptamışlar ve kısa sağ kalımla ilişkili bulmuşlardır (113).

Apoptoz ilişkili faktörlerin tümörlerin kemoresistivite ve kemoresistansta yer alabileceği düşünülmektedir. Bairey ve arkadaşları DBBHL'larda bcl-2 ve bax ekspresyonu ile kısa sağkalım arasında ilişki saptamışlardır. Daha uzun yaşayanlarda bcl-2 ekspresyonu daha az gözlenmiştir (114). Beklenmedik bir bulgu olarak bax ekspresyonunu da kısa sağ kalımla ve kemoresistansla ilişkili saptamışlardır. Bizim çalışmamızda NHL serimizde çalışılan apoptotik ilişkili faktörlerden hiçbiri kemoterapiye yanıt ile ilişkili saptanmamıştır.



Çalışılan tüm parametreler arasında yalnızca Aİ olaysız sağkalımla ilişkilidir. Bu durum pediatrik NHL'larda prognoz açısından apoptozla ilişkisini desteklemekle birlikte tek başına herhangi bir faktörün prognoz belirleyicisi saptanmaması apoptotik sürecin çok faktörlü karmaşık bir süreç olmasına bağlanabilir. Bu durum apoptoz mekanizması üzerinden tedavisel yaklaşımlarla ilgili çalışmalarda çok dikkatli olunması gerektiğini vurgulamaktadır. Potansiyel bir apoptoz süpresörü olan bcl-2'nin tüm insan kanserlerinde %50'den fazla oranlarda normal dışı bulunduğu bilinmektedir (40, 114). Bax ve bcl-2 ya da ilişkili proteinler beklenenin aksine genelde birlikte gözlenirler. Bu durum bir hücrenin sağ kalımı için apoptotik bir proteinin antiapoptotik proteinle birlikte bulunması gerektiği şekilde yorumlanmıştır (114). Bizim çalışmamızda HL ve NHL'da bax ve bcl-2 ve diğer faktörler arasında korelasyon saptanmamıştır.

Çalışmamızda pediatrik NHL'da fas/CD95 ekspresyonu % 18.6 (13 olgu) gözlenirken, bcl-2 %50, survivin %42,5, c-myc %45,7, bax %40, p53 %8.6 oranında gözlenmiştir. Bu bulgular literatürdeki çalışmalar ile uyumludur. NHL'da pozitive tüm parametrelerde değişik oranlarda olmak üzere, diffüz olarak ya da hücrelerin bazılarında dağınık olarak gözlenmiştir. Tüm parametrelerin yaş ve cinsiyet ile ilişkisi saptanmamıştır. Ayrıca kemoterapiye yanıtla bu çalışmada araştırılan apoptoz ilişkili faktörler arasında istatistiksel ilişki saptanmamıştır. Aİ  $131.29 \pm 96.69$  (20-450)/5000 hücre bulunması pediatrik NHL'larda apoptozun sık görülen bir özellik olduğunu ancak değişken bir aralıkta seyrettiğini desteklemektedir. Fas ekspresyonunun düşük, buna karşın bcl-2 ve bax'ın yüksek oranda görülmesi pediatrik NHL da var olan apoptozun fas yolağından çok; bax, bcl-2 üzerinden kontrol edildiğini göstermektedir. Bcl-2'nin %50 oranı antiapoptotik mekanizmanın etkinliğini göstermektedir. Artmış proliferasyon aktivitesi ile birliktelik pediatrik NHL'lardaki diffüz agresif klinik ile uyumludur. Bcl-2 bir çok çalışmada lenfomalarda bağımsız negatif prognostik faktör olarak saptanmıştır (54). Apoptoza direnci temsil etmektedir.

Bir apoptoz proteinleri inhibitörü ailesi üyesi olan survivin insan genomundan hibridizasyon ve filtrasyon yöntemi ile elde edilmiştir. Mitotik iplikçiklerin mikrotübülleri ile birleşebilir. Kaspazlarla etkileşimi sonucu hücre apoptozunu önleyebilir. En güçlü apoptoz inhibitörlerinden biridir. Tedavide kullanılabilecek hedef bir protein olduğu için bir çok tümörde çalışılmaktadır. Survivin'in karsinogeneze katılım mekanizması tam olarak açıklanmamıştır. Kolorektal karsinom patogenezinde erken bir olay olduğu düşünülmektedir (69). Ancak gastrik karsinom, akciğer kanseri ve meme kanseri ile ilgili çalışmalarda

survivin'in yalnızca invazyon metastaz gibi malign biyolojik davranışla ilişkili olmadığı, bunların yanında rekürrens ve cerrahi sonrası azalmış sağkalım süresi ile de ilişkili olduğu saptanmıştır (57,68,69). Bir çalışmada survivin mesane kanserinde survivin Ki-67 proliferasyon indeksi ile korele bulunurken, apoptotik indeksle ilişkisiz saptanmıştır (56).

Rassidakis ve arkadaşları ALK+ ABHL olgularında bcl-2 ekspresyonu saptamazken ALK- olgularda %60 oranında gözlemişlerdir (102). Bizim NHL serimizde LBL ve DBBHL'larda %91 oranında bcl-2 pozitifliği saptanırken, BuBuBL olgularının %71'i bcl-2 negatiftir. ABHL'larda ise dört olgu negatiftken beş olgu pozitif, PTHL'da ise iki olgu negatif ve bir olgu pozitif saptanmıştır. Bulgularımız BuBuBL olgularında neoplastik süreçte antiapoptotik etkiden çok artmış proliferasyon aktivitesi etkisinin daha ön planda olduğu görüşünü desteklemektedir.

Bax LBL olgularının %90'ında negatiftir. BuBuBL'ların ise yaklaşık yarısının bax pozitif olması BuBuBL'larda proliferasyona tümöral gelişimi önleyemeyecek oranda eşlik eden apoptoz mekanizmasında bax'ın da rol aldığını desteklemektedir. Fas ekspresyonu tüm NHL'larda %18.6 ile düşük oranda izlenmekte olup LBL'da bu oran %8'dir. Fas'ın apoptotik süreçte bizim serimizde NHL'da etkin olmadığı düşünülmüştür. Bunun yanında survivin'in %43 pozitifliği antiapoptotik süreçte ekstra sellüler etkiden çok kaspazlar aşamasında bir blokajın ön planda etkin olabileceğini düşündürmektedir. Survivin pozitifliği NHL histolojik tipler arasında ekspresyon farklılığı göstermemiştir.

P53 knockout farelerde malign lenfoma insidansı fazladır (32, 33). P53 ekspresyonu nazal NK/T hücre lenfomalarda yüksek oranda saptanmıştır. P53 gen mutasyonu ile protein ekspresyonu korele değildir. EBV ile p53 ilişkisini araştıran çalışmalar vardır. NHL'larda EBV pozitif olgularda p53 ve p21 düzeyleri yüksek bulunmuştur. Enfeksiyöz mononükleozda nonneoplastik B hücrelerinin p53 up-regülasyonu saptanması, neoplastik transformasyondan çok EBV nin p53'ü etkilediğini düşündürmüştür (34). Lenfoid hücrelerde p53 artmış ekspresyonunu etkileyen birçok faktör vardır (35). Çocukluk çağı B hücreli NHL'da mutasyonlarla ilişkisiz p53 ekspresyonunun EBV ile ilişkili olamayacağı yönünde görüşler vardır (36). NHL serimizde p53 ekspresyon oranının düşüklüğü beklenen bir sonuçtur ancak p53 pozitif olan az sayıda olgu BuBuBL ve ABHL gurubundandır. LBL, DBBHL ve PTHL olguların tümü p53 negatiftir. NHL 'da da p53'ün patogeneizde rolü olacağını düşündürten çalışmalar vardır (38).

Pediatric HL serimizde sonuçlarımızda EBV latent enfeksiyonunun %82.5 değeri ile yüksek oranda gözlenmesi, EBV positive olgularda proliferasyon aktivitesinin yüksek, apoptotik indeksin düşük saptanması, EBV'ün HL patogenezinde proliferatif aktiviteyi tetikleyerek ve apoptozu önleyerek rol oynayabileceği hipotezini destekler özelliktedir. Ancak Pİ ve Aİ prognoz belirleyicisi saptanmamıştır. Bu çalışmada yer alan apoptoz ilişkili faktörlerin prognoz ya da EBV ile ilişkili bulunmaması HL' da EBV'nin apoptozu önlemede BHRF-1 gibi direk kendi aktif proteinleri ile ya da birçok apoptotik mekanizmayı bir arada etkiliyor olabileceğini düşündürmektedir. Tüm bulgular ile hedeflenmiş tedaviler açısından HL'da direk EBV'nin iyi bir hedef olacağı düşünülmüştür.

Pediatric NHL serimizde ise EBV birlikteliğinin çoğunluğu BuBuBL'da olmak üzere %25.7 olduğu ve EBV birlikteliğinin prognoz belirleyicisi olmadığı gösterilmesi, NHL EBV birlikteliği olan ya da olmayan olguların proliferasyon aktivitesinin değişmediği saptanması, EBV latent enfeksiyonunun proliferasyonu tek başına etkilemediğini düşündürmektedir.

Apoptoz ilişkili faktörler değişik oranlarda NHL olgularında gözlenmektedir. Bunlardan EBV fas ile ilişkili, bcl-2 ters ilişkili saptanmıştır. Bu ilişki NHL özellikle BuBuBL'da EBV latentliği ve onkogenik etkisine Imp-1'in katılmaması ile açıklanabilir.

Apoptoz ilişkili faktörler prognoz üzerine etkili bulunmazken Aİ'nin prognoz ile ilişkili saptanması (korelasyon analizi) (olaysız olgularda Aİ yüksektir) yine apoptozun multipl faktörlü karmaşık bir süreç olması ile açıklanabilir. NHL'larda neoplastik gelişimde EBV'den çok T ve B hücrelerinde görülen mutasyonlarda ortaya çıkan proliferasyon artışı ve apoptoz engellenişi daha ön plandadır. Her bir alt NHL histolojik grubun daha geniş olgu serilerinde çalışılması yararlı olabilir.

NHL tedavisinde birçok neoplazide olduğu gibi nonspesifik sitotoksik ajanlardan hedeflenmiş tedavilere geçiş sözkonusudur. Faz 1, faz 2 çalışmalar oldukça yol almıştır. Artan genomik, proteomik çalışmalarla genetik ve biyolojik temele dayalı yeni sınıflamalara, prognostik alt gurupların ayrılmasına fırsat vermektedir. Hastalık ve hatta hastaya özgün tedavi modelleri ile ilgili çalışmalar olanaklı hale gelmektedir. pediatik NHL' da varolan tedavilerle sağkalım ve tedavi yanıtları başarılı olduğu için, çocuk yaş gurubunda olgu sayısı az olduğu için, çocukluk yaş gurubunda klinik ilaç araştırma planlaması daha zor olduğu için, çocuklar üzerinde yapılacak çalışmalarda kanuni ve etik kısıtlamalar bulunduğu için hedeflenmiş tedavilerle ilgili çalışmalar faz 1 düzeylerde tek tük az sayıda çalışma ile sınırlıdır. Bu hastalık gurubunda temel hedef rekürrensi önlemedir. Gelecekte biyolojik

tedavilerin kombinasyonu ve tedavi etkisi için optimizasyonu şeklinde çalışmalar planlanacaktır. Patolojiye hedeflenmiş tedavilere yönelik biyolojik parametrelerin olgunun tümör hücrelerinde bulunma durumu ve kantitasyonu gibi sorumluluklar düşebilecektir (Survivin, EBV, CD30 gibi).

Neoplazide hücre proliferasyonu apoptoz ve hücre döngüsü, karsinogenezisle ilgili her gün artan sayıda yeni biyolojik parametreler keşfedilmekte ve literatüre eklenmektedir. Yeni gelişen ve giderek yaygınlaşacak olan mikroarray teknolojisi çoklu protein ve genler gibi moleküler değişkenleri geniş olgu serilerinde daha az emekle inceleme olanağı sağlamaktadır. Tüm bu çalışmalarla süzülecek yeni parametreler ayırıcı tanı, tedavi yönlendirme, tedavi etkisi ölçme, hastalıkların yeniden sınıflandırılması gibi konularda özellikle hematolenfoid malignitelerde kullanıma sunulacaktır.

## **9. SONUC**

Bulgularımız pediatrik HL serimizde EBV birlikteliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. EBV pozitif olan olgularda exitus ya da rekürrens daha az saptanması dikkati çekmektedir. EBV ilişkili olguların daha iyi prognoz ile seyredip seyretmeyeceğinin daha uzun süreli ve daha geniş ve çok merkezli serilerde çalışılması yararlı olacaktır. Pediatrik HL serimizde c-myc ekspresyonu yaklaşık dörtte üç olguda literatürdeki az sayıda çalışma ile uyumlu olarak pozitif saptanmıştır. EBV ve prognoz ile ilişkisiz saptanması neoplastik gelişimde, HRS hücre proliferasyonunda EBV'den bağımsız olarak yer almakta olduğunu desteklemektedir. Ancak c-myc ekspresyonu kötü gidiş ya da tedaviye yanıtızlığı göstermemektedir.

Pediatrik NHL serimizde ise EBV birlikteliğinin çoğunluğu BuBuBL'larda olmak üzere %25.7 olduğunu ve EBV birlikteliğinin prognoz belirleyicisi olmadığını göstermektedir. NHL EBV birlikteliği olan ya da olmayan olguların proliferasyon aktivitesinin değişmediği saptanmıştır. Bu bulgular EBV latent enfeksiyonunun proliferasyonu etkilemediğini düşündürmektedir. Ayrıca proliferasyon aktivitesi bu seride prognoz belirleyicisi bulunmamıştır. Apoptoz ilişkili faktörler değişik oranlarda NHL olgularında gözlenmektedir. Bunlardan fas EBV ile ilişkili bcl-2 ile ters ilişkili saptanmıştır. Apoptoz ilişkili faktörler prognoz üzerine etkili bulunmamıştır.

## **10. KAYNAKLAR**

1. Sarac S, Akyol MU, Kanbur B, Poyraz A ve ark. Bcl-2 and LMP1 expression in nasopharyngeal carcinomas. *Am J Otolaryngol.* 2001 ;22(6):377-82.
2. Jarrett RF. Viral involvement in Hodgkin's disease. *Int J Cell Cloning.* 1992; 10(6):315-22.
3. Campe H, Jaeger G, Abou-Ajram C, Nitschko H ve ark. Serial detection of Epstein-Barr virus DNA in sera and peripheral blood leukocyte samples of pediatric renal allograft recipients with persistent mononucleosis-like symptoms defines patients at risk to develop post-transplant lymphoproliferative disease. *Pediatr Transplant.* 2003; 7(1):46-52.
4. Pollock BH, Jenson HB, Leach CT, McClain KL ve ark. Risk factors for pediatric human immunodeficiency virus-related malignancy. *JAMA.* 2003; 289(18):2393-9.
5. Jung CK, Lee KY, Kim Y, Han K ve ark. Epstein-Barr virus infection, drug resistance and prognosis in Korean T- and NK-cell lymphomas. *Pathol Int.* 2001; 51(5):355-63.
6. Orentas RJ, Schauer DW Jr, Ellis FW, Walczak J ve ark. Monitoring and modulation of Epstein-Barr virus loads in pediatric transplant patients. *Pediatr Transplant.* 2003; 7(4):305-14.
7. Straathof KCM, Bollard CM, Rooney CM, Heshlop HE. Immunotherapy for Epstein-Barr- Virus Associated Cancers in Children. *The Oncologist* 2003; 8:83-98.
8. Preciado MV, Fallo A, Chabay P, Calcagno L, De Matteo E. Epstein Barr virus-associated lymphoma in HIV-infected children. *Pathol Res Pract.* 2002;198(5):327-32.
9. Cabalo E, Wilkinson R, Lu NT, Shimizu S ve ark. Molecular analysis and pathology of a second pediatric HIV-associated Burkitt lymphoma. *Pediatr Pathol Mol Med.* 2002; 21(6):525-30.
10. Parmley RT. Evolution of AIDS and AIDS related malignancies in pediatric patients in the United States. *J Nihon Univ Sch Dent.* 1997 ;39(1):8-11.
11. Roth J, Daus H, Gause A, Trumper L ve ark. Detection of Epstein Barr Virus DNA in Hodgkin and Reed Sternberg cells by single cell PCR. *Leuk Lymphoma* 1994; 13: 137-42.
12. Rao CR, Gutierrez MI, Bhatia K, Fend F ve ark. Association of Burkitt's lymphoma with the Epstein-Barr virus in two developing countries. *Leuk Lymphoma.* 2000; 39(3-4):329-37.

13. Araujo I, Foss HD, Bittencourt A, Hummel M ve ark. Expression of Epstein-Barr virus-gene products in Burkitt's lymphoma in Northeast Brazil. *Blood*. 1996; 87(12):5279-86.
14. Weinreb M, Day PJ, Niggli F, Green EK ve ark. The consistent association between Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease in children in Kenya. *Blood*. 1996; 87(9):3828-36.
15. Preciado MV, De Matteo E, Diez B, Menarguez J, Grinstein S. Presence of Epstein-Barr virus and strain type assignment in Argentine childhood Hodgkin's disease. *Blood*. 1995; 86(10):3922-9.
16. De Matteo E, Baron AV, Chabay P, Porta J ve ark. Comparison of Epstein-Barr virus presence in Hodgkin lymphoma in pediatric versus adult Argentine patients. *Arch Pathol Lab Med*. 2003; 127(10):1325-9.
17. Chabay PA, De Matteo EN, Aversa L, Maglio S ve ark. Assessment of Epstein-Barr virus association with pediatric non-hodgkin lymphoma in immunocompetent and in immunocompromised patients in Argentina. *Arch Pathol Lab Med*. 2002; 126(3):331-5.
18. Zhou XG, Sandvej K, Li PJ, Ji XL ve ark. Epstein-Barr virus (EBV) in Chinese pediatric Hodgkin disease: Hodgkin disease in young children is an EBV-related lymphoma. *Cancer*. 2001; 92(6):1621-31.
19. Tinguely M, Brundler MA, Gogos S, Kerl K, Borisch B. Epstein-Barr virus association in pediatric abdominal non-Hodgkin-lymphomas from Turkey. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2000; 48(4):317-22.
20. Durmaz R, Aydin A, Koroglu M, Aker H ve ark. Detection and genotyping of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction in tissues obtained from cases with Hodgkin's disease in Turkey. *Acta Virol*. 1998; 42(6):375-81.
21. Cavdar AO, Pamir A, Gozdasoglu S, Babacan E ve ark. Hodgkin disease in children: clinicoepidemiologic and viral (Epstein-Barr virus) analyses. *Med Pediatr Oncol*. 1999; 32(1):18-24.
22. Tacyildiz N, Cavdar AO, Ertem U, Oksal A ve ark. Unusually high frequency of a 69-bp deletion within the carboxy terminus of the LMP-1 oncogene of Epstein-Barr virus detected in Burkitt's lymphoma of Turkish children. *Leukemia*. 1998; 12(11):1796-805.

23. Ertem U, Duru F, Pamir A, Tacyildiz N ve ark. Burkitt's lymphoma in 63 Turkish children diagnosed over a 10 year period. *Pediatr Hematol Oncol.* 1996; 13(2):123-34.
24. Cavdar AO, Yavuz G, Babacan E, Gozdasoglu S ve ark. Burkitt's lymphoma in Turkish children: clinical, viral [EBV] and molecular studies. *Leuk Lymphoma.* 1994;14(3-4):323-30.
25. Cavdar AO, Gozdasoglu S, Yavuz G, Babacan E ve ark. Burkitt's lymphoma between African and American types in Turkish children: clinical, viral (EBV), and molecular studies. *Med Pediatr Oncol.* 1993; 21(1):36-42.
26. Ataoglu Ö, Fen T, Süer Ö, Dağlı M ve ark. Epstein-Barr Virus latent membrane protein 1 (LMP-1) in Hodgkin's lymphoma patients in Turkey. *Turk J Haematol* 2001; 18(2):123.
27. Yilmaz F, Uzunlar AK, Sogutcu N, Ozaydin M. Hodgkin's disease and association with Epstein-Barr virus in children in Southeast Turkey. *Saudi Med J.* 2005; 26(4):571-5.
28. Zeytinoglu A, Hekimgil M, Erensoy S, Aydemir S ve ark. Investigation of Epstein-Barr virus DNA and RNA in tissues of patients with lymphoma. *Mikrobiyol Bul.* 2005; 39(4):473-81.
29. Nakamura N, Nakamine H, Tamaru J, Nakamura S ve ark. The distinction between Burkitt lymphoma and diffuse large B-Cell lymphoma with c-myc rearrangement. *Mod Pathol.* 2002; 15(7):771-6.
30. Wennborg AD, Altiok E, Moore JP, Ernberg I, Klein G. Differential c-myc protein expression in Burkitt's lymphomas and EBV-transformed lymphoblastoid lines. *Eur J Cancer.* 1991; 27(12):1643-5.
31. Jiwa NM, Kanavaros P, van der Valk P, Walboomers JM ve ark. Expression of c-myc and bcl-2 oncogene products in Reed-Sternberg cells independent of presence of Epstein-Barr virus. *J Clin Pathol.* 1993; 46(3):211-7.
32. Brown DC, Gatter KC, and Mason DY. Proliferation in non-Hodgkin's lymphoma: a comparison of Ki-67 staining on fine needle aspiration and cryostat sections. *J Clin Pathol* 1990; 43: 325-328.
33. Nagy N, Takahara M, Nishikawa J, Bourdon JC ve ark. Wild-type p53 activates SAP expression in lymphoid cells. *Oncogene.* 2004; 23(53):8563-70.



34. Klumb CE, Hassan R, Zalcborg IR, Resende LM ve ark. p53 protein expression does not correlate with EBV status in childhood B non-Hodgkin lymphomas. *Pediatr Blood Cancer*. 2004; 43(2):115-9.
35. Hirose Y, Fukushima T, Masaki Y, Shimoyama K ve ark. Epstein-Barr virus-associated composite lymphoma composed of peripheral T-cell lymphoma and an anaplastic variant of a diffuse large B-cell type of non-Hodgkin's lymphoma and strongly expressing p53 protein. *Int J Hematol*. 2004; 79(3):260-5.
36. Qi ZL, Zhao T, Zhou XH, Zhang JH ve ark. Expressions of latent membrane protein 1, p53 and bcl-2 proteins and their significance in Hodgkin's lymphoma. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. 2003; 23(3):225-7.
37. Takahara M, Kishibe K, Bandoh N, Nonaka S, Harabuchi Y. P53, N- and K-Ras, and beta-catenin gene mutations and prognostic factors in nasal NK/T-cell lymphoma from Hokkaido, Japan. *Hum Pathol*. 2004; 35(1):86-95.
38. Nakatsuka S, Hongyo T, Syaifudin M, Nomura T ve ark. Mutations of p53, c-kit, K-ras, and beta-catenin gene in non-Hodgkin's lymphoma of adrenal gland. *Jpn J Cancer Res*. 2002; 93(3):267-74.
39. Klumb CE, Furtado DR, de Resende LM, Carrico MK ve ark. DNA sequence profile of TP53 gene mutations in childhood B-cell non-Hodgkin's lymphomas: prognostic implications. *Eur J Haematol*. 2003; 71(2):81-90.
40. Jiwa NM, Kanavaros P, van der Valk P, Walboomers JM ve ark. Expression of c-myc and bcl-2 oncogene products in Reed-Sternberg cells independent of presence of Epstein-Barr virus. *J Clin Pathol*. 1993; 46(3):211-7.
41. Komano J, Takada K. Role of bcl-2 in Epstein-Barr virus-induced malignant conversion of Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Virol*. 2001; 75(3):1561-4.
42. Kim LH, Nadarajah VS, Peh SC, Poppema S. Expression of Bcl-2 family members and presence of Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death in classical Hodgkin's lymphoma. *Histopathology*. 2004; 44(3):257-67.
43. Wu L, Gu G, Ma D. EB virus infection and expression of P53 and P16 in non-Hodgkin's lymphoma. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. 1999; 34(6):359-6.
44. Lindstrom MS, Wiman KG. Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol*. 2002; 12(5):381-7.

45. Camilleri-Broet S, Camparo P, Mokhtari K, Hoang-Xuan KH ve ark. Overexpression of BCL-2, BCL-X, and BAX in primary central nervous system lymphomas that occur in immunosuppressed patients. *Mod Pathol.* 2000; 13(2):158-65.
46. Kanavaros P, Ioannidou D, Tzardi M, Datselis G ve ark. Mycosis fungoides: expression of C-myc p62 p53, bcl-2 and PCNA proteins and absence of association with Epstein-Barr virus. *Pathol Res Pract.* 1994; 190(8):767-74.
47. Brousset P, Benharroch D, Krajewski S, Laurent G ve ark. Frequent expression of the cell death-inducing gene Bax in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Blood.* 1996; 87(6):2470-5.
48. Baiocchi RA, Khatri VP, Lindemann MJ, Ross ME ve ark. Phenotypic and functional analysis of Fas (CD95) expression in primary central nervous system lymphoma of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Blood.* 1997; 90(5):1737-46.
49. Schattner EJ, Mascarenhas J, Bishop J, Yoo DH ve ark. CD4+ T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells. *Blood.* 1996; 88(4):1375-82.
50. Gutierrez MI, Cherney B, Hussain A, Mostowski H ve ark. Bax is frequently compromised in Burkitt's lymphomas with irreversible resistance to Fas-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1999; 59(3):696-703.
51. Verbeke CS, Wenthe U, Grobholz R, Zentgraf H. Fas ligand expression in Hodgkin lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2001; 25(3):388-94.
52. Durandy A, Le Deist F, Emile JF, Debatin K, Fischer A. Sensitivity of Epstein-Barr virus-induced B cell tumor to apoptosis mediated by anti-CD95/Apo-1/fas antibody. *Eur J Immunol.* 1997; 27(2):538-43.
53. Jeon YK, Kim H, Park SO, Choi HY ve ark. Resistance to Fas-mediated apoptosis is restored by cycloheximide through the downregulation of cellular FLIP(L) in NK/T-cell lymphoma. *Lab Invest.* 2005;85(7): 874-84.
54. Rashed MM, Ragap NM. The pattern of expression of the apoptotic inducer Fas and the apoptotic inhibitor bcl-2 oncogenes immunohistochemically in bone-marrow invaded by the non-Hodgkin lymphomas. *Turk J Hematol* 2004; 21: 141-147.
55. Faqing T, Zhi H, Liqun Y, Min T ve ark. Epstein-Barr virus LMP1 initiates cell proliferation and apoptosis inhibition via regulating expression of Survivin in nasopharyngeal carcinoma. *Exp Oncol.* 2005; 27(2):96-101.

56. Wu Y, Wang G, Wei J, Wen X. Survivin protein expression positively correlated with proliferative activity of cancer cells in bladder cancer. *Indian J Med Sci.* 2005; 59(6):235-42.
57. Kuo PC, Liu HF, Chao JI. Survivin and p53 modulate quercetin-induced cell growth inhibition and apoptosis in human lung carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2004; 279(53):55875-85.
58. Cohen C, Lohmann CM, Cotsonis G, Lawson D, Santoianni R. Survivin expression in ovarian carcinoma: correlation with apoptotic markers and prognosis. *Mod Pathol.* 2003; 16(6):574-83.
59. Martinez A, Bellosillo B, Bosch F, Ferrer A ve ark. Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival. *Am J Pathol.* 2004; 164(2):501-10.
60. Nakayama K, Kamihira S. Survivin an important determinant for prognosis in adult T-cell leukemia: a novel biomarker in practical hemato-oncology. *Leuk Lymphoma.* 2002; 43(12):2249-55.
61. Qiao JG, Zhang YQ, Yin YC, Tan Z. Expression of Survivin in pancreatic cancer and its correlation to expression of Bcl-2. *World J Gastroenterol.* 2004; 10(18):2759-61.
62. Ito R, Asami S, Motohashi S, Ootsuka S ve ark. Significance of survivin mRNA expression in prognosis of neuroblastoma. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28(4):565-8.
63. Idenoue S, Hirohashi Y, Torigoe T, Sato Y ve ark. A potent immunogenic general cancer vaccine that targets survivin, an inhibitor of apoptosis proteins. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(4):1474-82.
64. Caldas H, Honsey LE, Altura RA. Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Mol Cancer.* 2005;4(1):11.
65. Dai DJ, Lu CD, Lai RY, Guo JM ve ark. Survivin antisense compound inhibits proliferation and promotes apoptosis in liver cancer cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11(2):193-9.
66. Wang JX, Zheng S. Caspase-3 and survivin expression in pediatric neuroblastoma and their roles in apoptosis. *Chin Med J (Engl).* 2004 ;117(12):1821-4.
67. Li F, Yang J, Ramnath N, Javle MM, Tan D. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? *Int J Cancer.* 2005;114(4):509-12.

68. Tsuruma T, Hata F, Torigoe T, Furuhashi T ve ark. Phase I clinical study of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent colorectal cancer. *J Transl Med.* 2004 13;2(1):19.
69. Tan HY, Liu J, Wu SM, Luo HS. Expression of a novel apoptosis inhibitor-survivin in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2005;11(30):4689-92.
70. Non-Hodgkin Lymphoma. In: WHO, Tumors of Haematopoietic and lymphoid tissues, Pathology and genetics. (Jaffe ES, Haris NL, Stein H, Vardiman JW eds) IARC, Lyon,2001, p:179-182, 257-262.
71. Hodgkin Lymphoma. In: WHO Classification of Tumors. Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. (Jaffe ES, Haris NL, Stein H, Vardiman JW eds). IARC, Lyon 2001; pp:237-253.
72. Amini RM, Enblad G, Engstrom P, Christensson B ve ark. Relapsed Hodgkin's lymphoma: immunostaining patterns in relation to survival. *Leuk Lymphoma.* 2002;43(6):1253-60.
73. Tebbi CK, Mendenhall N, London WB, Williams JL ve ark., Children's Oncology Group. Treatment of stage I, IIA, IIIA1 pediatric Hodgkin disease with doxorubicin, bleomycin, vincristine and etoposide (DBVE) and radiation: a Pediatric Oncology Group (POG) study. *Pediatr Blood Cancer.* 2006; 46(2):198-202.
74. Schwartz CL. Prognostic factors in pediatric Hodgkin disease. *Curr Oncol Rep.* 2003; 5(6):498-504.
75. de Jong D, Bosq J, MacLennan KA, Diebold J ve ark.; European Organization for Research and Treatment of Cancer Lymphoma Group; Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma (LRCHL): clinicopathological characteristics and outcome of a rare entity. *Ann Oncol.* 2006; 17(1):141-5.
76. Donaldson SS. Pediatric Hodgkin's disease--up, up, and beyond. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002; 54(1):1-8.
77. Naresh KN, Agarwal B, Nathwani BN, Diebold J ve ark. Use of the World Health Organization (WHO) classification of non-Hodgkin's lymphoma in Mumbai, India: a review of 200 consecutive cases by a panel of five expert hematopathologists. *Leuk Lymphoma.* 2004; 45(8):1569-77.

78. Lones MA, Sanger WG, Le Beau MM, Heerema NA ve ark.; Children's Cancer Group Study CCG-E08. Chromosome abnormalities may correlate with prognosis in Burkitt/Burkitt-like lymphomas of children and adolescents: a report from Children's Cancer Group Study CCG-E08. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2004;26(3):169-78.
79. Cairo MS, Sposto R, Perkins SL, Meadows AT ve ark. Burkitt's and Burkitt-like lymphoma in children and adolescents: a review of the Children's Cancer Group experience. *Br J Haematol.* 2003; 120(4):660-70.
80. Seidemann K, Tiemann M, Schrappe M, Yakisan E ve ark. Short-pulse B-non-Hodgkin lymphoma-type chemotherapy is efficacious treatment for pediatric anaplastic large cell lymphoma: a report of the Berlin-Frankfurt-Munster Group Trial NHL-BFM 90. *Blood.* 2001; 97(12):3699-706.
81. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G ve ark. The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting—Airlie House, Virginia, November, 1997. *Hematol J.* 2000; 1(1):53-66.
82. Diebold J, Anderson JR, Armitage JO, Connors JM ve ark. Diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic analysis of 444 cases.classified according to the updated Kiel classification. *Leuk Lymphoma.* 2002; 43(1):97-104.
83. Jaffe ES, Diebold J, Harris NL, Muller-Hermelink HK ve ark. Burkitt's lymphoma: a single disease with multiple variants. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. *Blood.* 1999; 93(3):1124.
84. Brousse N, Vasiliu V, Michon J, Canioni D. Pediatric non-Hodgkin lymphomas. *Ann Pathol.* 2004; 4(6):574-86.
85. Weitzman S, Suryanarayan K, Weinstein HJ. Pediatric non-Hodgkin's lymphoma: clinical and biologic prognostic factors and risk allocation. *Curr Oncol Rep.* 2002;4(2):107-13.
86. Perkins SL. Work-up and diagnosis of pediatric non-Hodgkin's lymphomas. *Pediatr Dev Pathol.* 2000;3(4):374-90.
87. Suryanarayan K, Shuster JJ, Donaldson SS, Hutchison RE ve ark. Treatment of localized primary non-Hodgkin's lymphoma of bone in children: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 1999; 17(2):456-9.

88. Frost M, Newell J, Lones MA, Tripp SR ve ark. Comparative immunohistochemical analysis of pediatric Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2004; 121(3):384-92.
89. Raetz E, Perkins S, Davenport V, Cairo MS. B large-cell lymphoma in children and adolescents. *Cancer Treat Rev.* 2003; 29(2):91-8.
90. Sugimoto M, Tahara H, Ide T, Furuichi Y. Steps involved in immortalization and tumorigenesis in human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Res.* 2004; 64(10):3361-4.
91. Kennedy G, Komano J, Sugden B. Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(24):14269-74.
92. Gan RL, Yin ZH, Liu TF, Dong BH ve ark. Molecular pathological characteristics of human B-cell lymphomas induced by Epstein-Barr virus. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai).* 2003; 35(10):925-9.
93. Melo N, Matutes E, Cordone I, Morilla R, Catovsky D. Expression of Ki-67 nuclear antigen in B and T cell lymphoproliferative disorders. *J Clin Pathol* 1992; 45: 660-663.
94. Morente MM, Piris MA, Abaira V, Acevedo A ve ark. Adverse Clinical Outcome in Hodgkin's Disease Is Associated With Loss of Retinoblastoma Protein Expression, High Ki67 Proliferation Index, and Absence of Epstein-Barr Virus-Latent Membrane Protein 1 Expression. *Blood* 1997; 90: 2429-2436.
95. Oyarzo MP, Drakos E, Atwell C, Amin HM ve ark. Intrinsic apoptotic pathway in anaplastic large cell lymphoma. *Hum Pathol.* 2006; 37(7):874-82.
96. Kim LH, Peh SC, Poppema S. Expression of retinoblastoma protein and P16 proteins in classic Hodgkin lymphoma: relationship with expression of p53 and presence of Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death. *Hum Pathol.* 2006; 37(1):92-100.
97. Clarke LE, Bayerl MG, Bruggeman RD, Mauger D ve ark. Death receptor apoptosis signaling mediated by FADD in CD30-positive lymphoproliferative disorders involving the skin. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29(4):452-9.
98. Arai M, Sasaki A, Saito N, Nakazato Y. Immunohistochemical analysis of cleaved caspase-3 detects high level of apoptosis frequently in diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system. *Pathol Int.* 2005; 55(3):122-9.

99. Kim LH, Eow GI, Peh SC, Poppema S. The role of CD30, CD40 and CD95 in the regulation of proliferation and apoptosis in classical Hodgkin's lymphoma. *Pathology*. 2003; 35(5):428-35.
100. Zhao WL, Daneshpouy ME, Mounier N, Briere J ve ark. Prognostic significance of bcl-xL gene expression and apoptotic cell counts in follicular lymphoma. *Blood*. 2004; 103(2):695-7.
101. Rassidakis GZ, Jones D, Lai R, Ramalingam P ve ark. BCL-2 family proteins in peripheral T-cell lymphomas: correlation with tumour apoptosis and proliferation. *J Pathol*. 2003; 200(2):240-8.
102. Rassidakis GZ, Sarris AH, Herling M, Ford RJ ve ark. Differential expression of BCL-2 family proteins in ALK-positive and ALK-negative anaplastic large cell lymphoma of T/null-cell lineage. *Am J Pathol*. 2001; 159(2):527-35.
103. Erdoğan BB, Uzaslan EK. Apoptozis Mekanizmaları: Tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi* 2003; 4: 165-174.
104. Alenzi FQ. Apoptosis and diseases. Regulation and clinical relevance. *Saudi Med J* 2005; 26: 1679-1690.
105. Prochazkova J, Kylarova D, Vranka P, Lichnovsky V. Comparative study of apoptosis-detecting techniques: TUNEL, apostain, and lamin B. *Biotechniques*. 2003; 35(3):528-34.
106. Rassidakis GZ, Medeiros LJ, McDonnell TJ, Viviani S ve ark. BAX expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease: correlation with clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 2002; 8(2):488-93.
107. Xu ZG, Iwatsuki K, Oyama N, Ohtsuka M ve ark. The latency pattern of Epstein-Barr virus infection and viral IL-10 expression in cutaneous natural killer/T-cell lymphomas. *Br J Cancer*. 2001;84(7):920-5.
108. Keegan TH, Glaser SL, Clarke CA, Gulley ML ve ark. Epstein-Barr virus as a marker of survival after Hodgkin's lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol*. 2005; 23(30):7604-13.
109. Amirghofran Z, Monabati A, Khezri A, Malek-Hosseini Z. Apoptosis in transitional cell carcinoma of bladder and its relation to proliferation and expression of p53 and bcl-2. *Pathol Oncol Res*. 2004; 10(3):154-8.

110. Spector N, Milito CB, Biasoli I, Luiz RR ve ark. The prognostic value of the expression of Bcl-2, p53 and LMP-1 in patients with Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2005; 46(9):1301-6.
111. Chabay P, Pesce P, De Matteo E, Lombardi MG ve ark. No Influence of bcl-2, p53, and p21waf1 protein expression on the outcome of pediatric Hodgkin lymphomas. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2006; 28(9):552-8.
112. Garcia-Sanz R, Montero MV, Diaz MG ve ark. Detection of single and associated lesions of the Bcl-1, Bcl-2, Bcl-6, c-myc, p53 and p16 genes in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: value of molecular analysis for a better assignment of the histologic subtype. *Haematologica* 1998; 83 (3): 209-216.
113. Pagnano KB, Vassallo J, Lorand-Metze I, Costa FF, Saad ST. p53, Mdm2, and c-Myc overexpression is associated with a poor prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Hematol*. 2001; 67(2):84-92.
114. Bairey O, Zimra Y, Shaklai M, Okon E, Rabizadeh E. Bcl-2, Bcl-X, Bax, and Bak expression in short- and long-lived patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Clin Cancer Res*. 1999; 5(10):2860-6.





T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI  
DR. BEHÇET UZ ÇOCUK HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ  
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ  
YEREL ARAŞTIRMA ETİK KURULU

Evrak No : 14  
Konu : Doç.Dr. Safiye Aktaş'ın çalışması.  
Tarih : 08.06.2005

Sayın Doç.Dr. Safiye Aktaş

"Epstein Barr Virüs Pozitif ve Negatif Pediatrik Hodgkin ve nonHodgkin Lenfomalarda Hücre Proliferasyonu ve Apoptotik İlişkili Faktörler ve Araştırılan Tüm Faktörlerin Prognoz ile İlişkisi" isimli Doç. Dr. Safiye Aktaş'ın sorumlu araştırmacı olduğu çalışmaya 08.06.2005 tarihinde Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yerel Araştırma Etik Kurulunca ön onay verilmiştir.

İsim

İmza

Uzm. Dr. Aysel Öztürk

Doç.Dr. Vedide Tavlı

Doç.Dr. Mukadder Yasa

Doç.Dr. Cenk Can

Uzm. Dr. Münevver Hoşgör

Uzm. Dr. Ercan Öztürk