



**T.C.**

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**MANTLE CELL LENFOMA HASTALARINDA RHO-KİNAZ  
GEN POLİMORFİZMLERİ**

**VE**

**PROTEİN EKSPRESYONLARININ**

**(SİKLİN D1, P53, P-63, Ki-67, ROCK1 VE ROCK2)**

**ARAŞTIRILMASI**

**YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Didar YANARDAĞ AÇIK**

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**HEMATOLOJİ BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Mehmet YILMAZ**

**TEMMUZ - 2013**

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından TF.12.38 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.  
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI, HEMATOLOJİ BD

TEZİN ADI  
MANTLE CELL LENFOMA HASTALARINDA RHO-KİNAZ GEN POLİMORFİZMLERİ  
VE PROTEİN EKSPRESYONLARININ (SİKLİN D1, P53, P-63, Kİ-67, ROCK1 VE ROCK2)  
ARAŞTIRILMASI

DR. DİDAR YANARDAĞ AÇIK

15.07.2013

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

Prof.Dr. Levent ELBEYLİ  
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının "Tıpta Uzmanlık" derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Vahap OKAN  
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile "Tıpta Uzmanlık" tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

Prof. Dr. Mehmet YILMAZ  
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof. Dr. Vahap OKAN
2. Prof. Dr. Mehmet YILMAZ
3. Doç.Dr. Mehmet EMİN KALENDER

## I. ÖNSÖZ

Eğitimim boyunca bilimsel ve kişisel desteğini esirgemeyen tez hocam Prof. Dr. Mehmet YILMAZ'a,

Bu tezi hazırlamamda çok emeği olan Prof. Dr. A.Tuncay DEMİRYÜREK'e,

Tez çalışmamda bilgi ve kişisel desteğini esirgemeyen Prof. Dr. İbrahim SARI'ya,  
Yrd. Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU'ya,

Yetişmemde ve bu günlere gelmemde en büyük emeği geçen canım anneme,

Her zaman ve her konuda yanımda olan sevgili eşim Vedat AÇIK'a,

Bu tezi harırlarken birlikte geçireceğimiz zamanlarından çaldığım canım kızlarım  
Sudenaz AÇIK ve Zeynep Su AÇIK'a,

Aferez Ünitesi çalışanlarından sevgili Semanur EKİN'e, Yıldız KARANI'ye,  
İbrahim ÖZASLAN'a, H. İbrahim GÜRBÜZ'e ve Hakan TEBİR'e

Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı sorumlu hemşiresi Dilek TEKİN'e

Kemik İliği Nakil Ünitesi hemşireleri Sevda ALKAN'a, Nigar YALÇIN'a ve  
Merve KARSLI'ya

Teşekkürlerimi sunarım

Dr. Didar Yanardağ AÇIK

Gaziantep 2013

## II. İÇİNDEKİLER

I.ÖNSÖZ	I
II.İÇİNDEKİLER	II
III.ÖZET	IV
IV.ABSTRACT	VI
V.KISALTMALAR	VIII
VI.TABLO LİSTESİ	X
VII.ŞEKİL LİSTESİ	XI
VIII.RESİM LİSTESİ	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mantle Cell Lenfoma	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Epidemiyoloji	3
2.1.3. Klinik Özellikler	3
2.1.4 Patogenez ve Sitogenetik Özellikler	4
2.1.5. Patoloji	6
2.1.6. İmmünofenotipik Özellikler	7
2.1.7. Tanı	7
2.1.8. Evreleme	7
2.1.9. Risk Sınıflaması	8
2.1.10. Tedavi	9
2.2. Rho Kinaz ve Rho Kinazın Tümör Oluşumuna Katkısı	9
2.3. Siklin D1 ile İlişkili Gen ve Proteinler	11
2.4. p53	13
2.5. p63	13

2.6. Ki-67	14
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	15
3.1. Hasta ve Kontrol grubu	15
3.2. Örneklerin Alınması, Saklanması ve İncelenmesi	15
3.3. Doku Hazırlanması	15
3.4. Boyasız Kesitler ve Deparafinizasyon	15
3.5. İmmünohistokimyasal Boyama	16
3.6. Histopatolojik Skorlama	17
3.7. DNA İzolasyonu	17
3.8. PCR ile Gen Polimorfizmi Araştırılması	17
3.9. İstatistiksel Analiz	18
4. BULGULAR	19
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	37
7. KAYNAKLAR	38
8.EKLER	46
8.1. Etik kurul kararı	46

### III. ÖZET

**MANTLE CELL LENFOMA HASTALARINDA RHO-KINAZ GEN  
POLİMORFİZMLERİ  
VE  
PROTEİN EKSPRESYONLARINININ  
(SİKLİN D1, P53, P-63, Ki-67, ROCK1 VE ROCK2)  
ARAŞTIRILMASI**

**YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Didar YANARDAĞ AÇIK  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
HEMATOLOJİ BİLİM DALI  
TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Mehmet YILMAZ  
GAZİANTEP- Haziran/ 2013, 46 sayfa**

**Giriş:** Mantle cell lenfoma (MCL), siklin D1 aşırı ekspresyonu ile karakterize ve agresif seyirli bir nonHodgkin lenfoma alt grubudur.

Günümüzdeki mevcut tedavi yöntemleriyle kür elde edilemez. Bu nedenle MCL için ideal tedavi yöntemleri hala araştırılmaktadır ve yapılan araştırmalar hücre siklus fazının bozulması sonucu oluşan MCL'nin tedavisinde hücre içi yolakların önemli hedefler oluşturabileceğini göstermektedir. Hücre siklus düzenleyicilerinden p53, p63, Rho kinazların kanser patogeneğinde önemli rollerinin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Yine yapılan araştırmalarda Ki-67 proliferasyon indeksinin kanser hastalarında prognostik bir faktör olduğu gösterilmiştir.

**Amaç:** Bu çalışmada, siklin D1 ile p53, p63 ve Rho-kinaz (ROCK1 ve ROCK2) enzimleri arasında bir ilişki olabileceğini düşünerek, MCL'de siklin D1, p53, p63 ile ROCK1 ve ROCK2 protein ekspresyonlarını araştırmayı ve karşılaştırmayı, ayrıca ROCK1 ve ROCK2 gen polimorfizmlerini ve Ki-67 ekspresyonunun MCL hastalarında, tedaviye cevap, nüks ve prognozla ilişkisini araştırmayı amaçladık.

**Materyal ve Metod:** 2006-2012 yılları arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, hematoloji kliniğine kabul edilmiş, 60 MCL hastası ve 60 kontrol grubu retrospektif olarak çalışmaya alındı. Hematoksilin ve eozin boyalı tüm arşiv preparatları tekrar değerlendirilerek immunhistokimya ve PCR çalışması için seçildi. p53, p63, ROCK1 ve ROCK2 tümör hücrelerindeki boyanma oranına göre 0-3 arasında skorlandırıldı. Ki-67 ise boyanma oranına göre % olarak ifade edildi.

**Sonuç:** MCL hastalarında ROCK1 (P=0.0009) ve ROCK2 ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmıştı ((P<0.0001). Hasta grubunda ROCK2 ekspresyonu ROCK1'e göre daha fazlaydı (P<0.0001). Yaş ile ROCK1 arasında anlamlı pozitif korelasyon vardı. p53, Ki-67 ekspresyonları hasta grubunda kontrol grubuna göre artmıştı. ROCK1 geni polimorfizmleri analizinde hasta ve kontrol gruplarında herhangi bir polimorfizm saptanmamıştır. ROCK2 geni polimorfizmleri analizinde MCL hastaları ve kontrol grubunda görülen polimorfizmler arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

**Anahtar kelimeler:** Mantle cell lenfoma, ROCK1, ROCK2

#### IV. ABSTRACT

**INVESTIGATION OF RHO-KINASE GEN  
POLYMORPHISM  
AND  
EXPRESSION OF PROTEINS  
(CYCLIN D1, P53, P-63, Ki-67, ROCK1 AND ROCK2)  
IN MANTLE CELL LYMPHOMA PATIENTS**

**Dr. Didar YANARDAG ACIK  
DEPARTMENT OF INTERNAL MEDICINE  
RESIDENT THESIS, DEPARTMENT OF HEMATOLOGY  
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet YILMAZ  
Gaziantep – June/ 2013, 46 pages**

**Introduction;** Mantle cell lymphoma (MCL) is aggressive sub-type of Non-Hodgkin Lymphoma which is characterized by expression of cyclin D1. It is not a curable disease with available chemotherapeutic regimens in nowadays. Ideal therapeutic investigations are performed for this reason. These investigations were shown that cell cycle is deregulated in the cells and targeted therapies directed to phase of cell cycle may cause important development of therapies in MCL treatment. The cell cycle regulators p53, p63, Rho kinases play an important role in the pathogenesis of cancer has been reported to be. Again studies Ki-67 proliferation index was shown to be an important prognostic factor in cancer patients .

**Aim;** in this study, we thought that cyclin D1 and p53, p63 and Rho-kinase (ROCK1 and ROCK2) enzymes may be an association of, MCL. We planned to investigate and compare the protein expression profile cyclin D1, p53, p63, and with the ROCK1, ROCK2, and also ROCK2 gene ROCK1 polymorphisms and Ki-67 expression in patients with MCL. We also aimed to investigate response to treatment, the relationship between recurrence and prognosis.

**Material and Method;** This study was performed retrospectively and was included 60 MCL and 60 control group of patients who applied to hematology department of Gaziantep University of Medical School between 2006-2012 years. Hematoxylin and eosin stained slides in the entire archive was reevaluated and selected for immunohistochemistry and PCR again. p53, p63, ROCK1 and ROCK2 were scored to between 0-3 rates according to staining ratio in tumor cells. Ki-67 was expressed as % according to staining of tumor cells

**Result;** There was significant increase between ROCK1 (P=0.0009) and ROCK2 expression in MCL patients compared with control group (P<0.0001). ROCK2 expression was higher than ROCK1 in MCL patients (P<0.0001). There were significant positive correlations between age and ROCK1 p (p=0,044). Expression of p53 and Ki-67 were stronger in patient group than control group. There was no polymorphism detection in the analysis of ROCK1 gene polymorphism in patients and control groups. There was no significant relation in ROCK2 polymorphism in gene polymorphisms analysis between in MCL patients and control group.

**Key words: Mantle cell lymphoma, ROCK1, ROCK2**

## V. KISALTMALAR

<b>B2MG</b>	Beta 2 mikroglobulin
<b>bax</b>	Bcl-2-associated X protein
<b>BCL1</b>	B-cell leukaemia/lymphoma 1
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>CDK</b>	Siklin bağımlı kinaz
<b>COP</b>	Siklofosamid, vinkristin, prednison
<b>CR</b>	Tam yanıt
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>E2F</b>	Transkripsiyon uzama faktörü2
<b>ECOG</b>	Eastern Cooperative Group
<b>FISH</b>	Floresan in situ hibridizasyon
<b>GAP</b>	GTPaz aktive edici proteinler
<b>GDI</b>	GTPaz disosiyasyon inhibitörleri
<b>GDP</b>	Guanozin difosfat
<b>GEF</b>	Guanin nükleotid değiş-tokuş faktörleri
<b>GIS</b>	Gastrointestinal Sistem
<b>GTP</b>	Guanozin trifosfat
<b>GTPaz</b>	Guanozin trifosfataz
<b>LAP</b>	Lenfadenopati
<b>LDH</b>	Laktikdehidrogenaz
<b>MCL</b>	Mantle Cell Lenfoma
<b>MIPI</b>	Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index
<b>MTC</b>	Major Translocation Cluster
<b>NCCN</b>	National Comprehensive Cancer Network
<b>NHL</b>	Non-Hodgkin's Lymphoma
<b>PCR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PR</b>	Parsiyel yanıt
<b>Rb</b>	Retinoblastoma geni
<b>R-CHOP</b>	Rituximab- siklofosamid, adriamisin, vinkristin, prednison
<b>R-CVP</b>	Rituximab, cyclophosphamide, vincristine, and prednisone
<b>REAL</b>	Revised European- American Lymphoma
<b>REFR</b>	Refrakter
<b>R-FCM</b>	Rituximab- fludarabin, siklofosamid, mitoxantrone
<b>R-HIPERCVD</b>	Rituximab, cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, dexamethasone, alternating with methotrexate, and cytarabine
<b>Rho</b>	Ras homolog protein
<b>RLH</b>	Reaktif lenfoid hiperplazi
<b>RLPS</b>	Relaps



<b>ROCK</b>	Rho-Associated, Coiled-Coil Containing Protein Kinase (Rho-Associated Protein Kinase)
<b>SAM</b>	Steril alfa motif
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphisms
<b>SSS</b>	Santral Sinir Sistemi
<b>TBI</b>	Tüm vücut ışınlanması

## VI. TABLO LİSTESİ

**Tablo 1.** Basitleştirilmiş MIPI Skorlaması

**Tablo 2.** Çalışma popülasyonunun klinik özellikleri

**Tablo 3.** MCL hastalarının demografik özellikleri

**Tablo 4.** MCL hastalarında prognostik faktörlerin korelasyon analizi ile karşılaştırılması (istatistiksel olarak anlamlı olanlar)

**Tablo 5.** MCL hastalarında prognostik faktörlerle Rho-kinaz arasındaki korelasyonlar (istatistiksel olarak anlamsız olanlar)

**Tablo 6.** MCL hastalarında ROCK1, ROCK2, P53'ün immünohistokimyasal boyanma özellikleri

**Tablo 7.** MCL hastalarında Ki-67'nin sınıflandırılması, prognostik faktörler ve toplam sağkalımla ilişkisi

**Tablo 8.** Otolog kemik iliği transplantasyonu ile toplam sağ kalım arasındaki ilişki

**Tablo 9.** Tedaviye yanıtın MIPI skoru, ROCK1 ve ROCK2 protein ekspresyonu ile ilişkisi

**Tablo 10.** Hasta ve kontrol grubunda ROCK2 gen polimorfizmlerine ait genotip ve allel dağılımı.

## VII. ŞEKİL LİSTESİ

**Şekil 1.** MCL hasta ve kontrol grubundaki ROCK1 ve ROCK2 immunohistakimya skorları

**Şekil 2.** MCL hastalarında ROCK1, ROCK2, P53'ün immünohistokimyasal boyanma oranları

## VIII. RESİM LİSTESİ

**Resim 1.** MCL ve kontrol grubunun ROCK1 ve ROCK2 antikorları ile immunohistokimyasal boyanması .

**Resim 2.** MCL ve kontrol grubunun Ki-67 ile immunohistokimyasal boyanması

**Resim 3.** MCL ve kontrol grubunun p53 ile immunohistokimyasal boyanması

**Resim 4.** MCL ve kontrol grubunun p63 ile immunohistokimyasal boyanması

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mantle cell lenfoma (MCL)'nin tüm non-Hodgkin lenfomalar (NHL) içindeki oranı farklı serilerde %2-11 arasında değişmektedir (1). MCL insidansı yılda 2-3/100.000'dir. Erkeklerde 2 kat daha sık gözlenmektedir. Ortanca görülme yaşı 60-65 olup, tanı anında olguların büyük çoğunluğu ileri evrededir. Günümüzde kullanılan tedavi yöntemleriyle kür elde edilemez (2).

1984 yılında Tsujimoto ve arkadaşları tarafından t(11;14)(q13;q32) translokasyon kırılma noktası ve 11'inci kromozom üzerinde bulunan *B-cell leukaemia/lymphoma 1* (BCL1) adı verilen bölgenin gösterilmesi, bu lenfoma türünün tanınması açısından bir dönüm noktası teşkil etmiştir (3). Paratiroid adenomlarında gösterilmiş olması nedeniyle PRAD1 adı ile de bilinen BCL1, normalde siklin D1 proteinini kodlayan bir genidir (CCND1). Siklin D1, diğer siklinlerle birlikte hücre siklusunu kontrol ederek G1-S fazının başlatılmasında önemli rol oynamaktadır. MCL gelişimi sırasında t(11;14)(q13;q32) translokasyonu ile BCL1 geni (11q13) ile immünglobulin ağır zincir geni (14q32) yanyana gelmekte, bu şekilde BCL1 upregülasyonu söz konusu olmaktadır. Bu translokasyon sonucunda siklin D1 proteininin aşırı miktarda sentezlenmesi ve hücrelerin devamlı ve kontrolsüz olarak G1-S fazına girmesi söz konusu olmaktadır (1).

Rho-kinaz bir serin/treonin protein kinazdır ve moleküler ağırlığı yaklaşık 160 kDa'dur. Rho-kinaz enziminin ROCK1 (ROCKI, p160ROCK, ROCK $\beta$ , ROK $\beta$ ) ve ROCK2 (ROCKII, ROCK $\alpha$ , ROK $\alpha$ ) olarak iki izoformu vardır. İnsanda ROCK1 ve ROCK2 genleri sırası ile 18. kromozom (18q11.1) ve 2. kromozomda (2p24) yer almaktadır. Rho-kinaz enziminin hemen hemen her dokuda varlığı gösterilmiştir; ancak,

ROCK2'nin beyin ve kalpte, ROCK1'in akciğer, karaciğer, dalak, böbrek ve testiste daha fazla eksprese edildiği de bildirilmiştir (41).

Rho (*Ras-homologous*) proteinleri ve Rho-kinaz aktivitesinin çeşitli kanser modellerinde etkin role sahip olduğu gösterilmiştir. Yapılan hücre kültürü ve hayvan deneylerinde çeşitli Rho-kinaz inhibitörlerinin kullanımı ile kanser hücrelerinde migrasyonun ve metastaz özelliklerinin baskılandığı gösterilmiştir (4-6).

Son yapılan çalışmalarda SOX-11 adlı bir nöral transkripsiyon faktörünün hem siklin D1 negatif hem de siklin D1 pozitif MCL'da yeni bir marker olduğu ve SOX-11 ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (33, 69,70). Rho kinaz ve MCL ilişkisini araştırdığımız çalışmamızda ROCK2 protein ekspresyonunun MCL hastalarında anlamlı olarak arttığını gördük. ROCK2 geni 2. kromozomda (2p24) yer almaktadır. SOX-11 geni de 2. kromozomda (2p25) yer almaktadır. Hem ROCK2, hem de SOX-11'in 2. kromozomda ve yakın bölgelerde kodlanması bu iki gen mutasyon ve ekspresyonlarının MCL patogeneğinde ortak rol oynadıklarını ve her ikisinin de MCL'da tedavi hedefleri arasında yer alabileceklerini düşündürdü. Bu hipotezden yola çıkarak MCL'da ROCK1, ROCK2, SOX-11 arasındaki ilişkiyi ve MCL'lı hastalarda prognoza katkılarını araştırmayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. MANTLE CELL LENFOMA (MCL)

MCL, ileri yaşta ve erkeklerde daha sık görülen, siklin D1 aşırı ekspresyonu ile tanımlanan, B-hücreli, agresif seyirli bir non-Hodgkin lenfoma türüdür (1).

#### 2.1.1. Tarihçe

MCL ilk olarak 1990 sonrasında ayrı bir antite olarak tanımlanmıştır. MCL, morfolojik açıdan diğer düşük dereceli lenfomalara benzemesi nedeni ile 1990'lara kadar yavaş seyirli bir lenfoma olarak kabul edilmiştir. Hastalık için bir belirteç olarak kabul edilen BCL1 onkojeninin bulunması ve hastalık biyolojisi üzerinde yapılan yoğun çalışmalar, bu özel lenfoma türünün küçük lenfositik ve küçük çentikli hücreli lenfomalar ile bir ilişkisi bulunmadığını ve daha agresif seyri olduğunu göstermiştir (1).

#### 2.1.2. Epidemiyoloji

20. yy'ın ikinci yarısında non-Hodgkin lenfoma vakalarının oranında belirgin artış olmuştur (14). Ancak, MCL ve marjinal zon lenfoma gibi NHL alt tipleri sonradan tanımlandığından dolayı, bu alt tiplerin zaman trendini bilmek zordur (15). MCL'nin tüm non-Hodgkin lenfomalar içindeki oranı farklı serilerde %2-11 arasında değişmektedir (1). MCL insidansı yılda 2-3/100.000'dir. Erkeklerde 2 kat daha sık gözlenmektedir. Ortanca görülme yaşı 60-65 olup, tanı anında olguların büyük çoğunluğu ileri evrededir (2).

#### 2.1.3. Klinik Özellikler

MCL erkeklerde daha sık görülmektedir. Bir seride E/K oranı 6.5/1 bulunarak hastalığın cinsiyete bağlı olduğu öne sürülmüştür (16). Hastalar, diğer yavaş seyirli lenfomalara göre daha ileri yaşadadır. MCL olguları tipik olarak kliniğe, çok sayıda ancak bulky olmayan (2-5 cm) lenfadenopatiler ile başvururlar. Olguların yarıya

yakınında konstitüsyonel semptomlar bulunur, bunlar arasında en sık görülen kilo kaybıdır, gece terlemesi daha seyrek. Çoğu hastanın performans statüsü iyidir. Splenomegali, özellikle nodüler varyantta olmak üzere sık görülür (1).

MCL hastalarının %15-30'unda gastrointestinal sistem (GIS) tutulumu rapor edilmiştir. İki prospektif çalışmada, MCL hastalarındaki GIS tutulumunun literatürde belirtilenden daha fazla olduğu belirtilmiştir. Salar ve arkadaşları (17), tanı anında hastaların %92'sinde üst ya da alt GIS tutulumu olduğunu göstermişlerdir. Romaguera ve arkadaşlarının (18) yaptığı çalışmada ise hastaların %88'inde alt GIS, %43'ünde üst GIS'de MCL tutulumu olduğu histolojik olarak gösterilmiştir. Aynı çalışmada, tanı anında hastaların %26'sının GIS semptomlarla başvurduğu belirtilmiştir. GIS tutulumun yüksek olmasına rağmen, GIS endoskopik biyopsinin kullanılması, hastaların sadece %4'ünde tedavi değişikliğine neden olmuştur (17,18). Bu nedenle *The National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) rehberlerinde, endoskopi ya da kolonoskopi rutin tetkikler içerisinde önerilmemektedir. Ancak, GIS'in endoskopik değerlendirilmesi hastalığın evre I-II olduğunun kesinleştirilmesi ve başlangıç tedaviye cevabın değerlendirilmesi için gereklidir (19).

SSS tutulumu iki seride %4 ve %22 olarak rapor edilmiştir. Bu serilerden ikincisinde SSS tutulumunun blastik varyantta daha sık olduğu bildirilmiştir (20,21). Kemik iliği tutulumu oldukça sıktır. Bazı olgularda kemik iliği sahasınının %5-10'luk kısmında tutulum olabilmekte ve bu nedenle kemik iliği tutulumu gözden kaçırılabilir. Bazı olgularda ise bulky hastalık ile birlikte olan yaygın kemik iliği tutulumu ve lösemik kan tablosu izlenebilmektedir. Serum beta-2 mikroglobulin (B2MG) düzeyi %56, laktik dehidrogenaz (LDH) düzeyi ise %45 olguda yüksek olmaktadır (1). Monoklonal paraproteinemi, hipogamaglobulinemi ve Coombs testi pozitifliği olguların %10'undan azında izlenir (1). MCL'de ortalama sağkalım 3-5 yıldır (2).

#### **2.1.4. Patogenez ve Sitogenetik Özellikler**

1984 yılında Tsujimoto ve arkadaşları tarafından t(11;14)(q13;q32) translokasyon kırılma noktası ve 11'inci kromozom üzerinde bulunan *B-cell leukaemia/lymphoma 1*



(BCL1) adı verilen bölgenin gösterilmesi, bu lenfoma türünün tanınması açısından bir dönüm noktası teşkil etmiştir (3). Paratiroid adenomlarında gösterilmiş olması nedeniyle PRAD1 adı ile de bilinen BCL1, normalde siklin D1 proteinini kodlayan bir genidir (CCND1). Siklin D1, diğer siklinlerle birlikte hücre siklusunu kontrol ederek G1-S fazının başlatılmasında önemli rol oynamaktadır. MCL gelişimi sırasında t(11;14)(q13;q32) translokasyonu ile BCL1 geni (11q13) ile immünglobulin ağır zincir geni (14q32) yanyana gelmekte, bu şekilde BCL1 upregülasyonu söz konusu olmaktadır. Bu translokasyon sonucunda siklin D1 proteininin aşırı miktarda sentezlenmesi, hücrelerin devamlı ve kontrolsüz olarak G1-S fazına girmesi söz konusu olmaktadır.

Boch ve arkadaşlarının 1994'de yaptıkları çalışmada (22), daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak, 20 MCL vakasının 19'unda aşırı siklin D1 gen ekspresyonu tespit etmişlerdir. Yine aynı çalışmada 113 MCL dışı kronik lenfoid malignensi ve 9 reaktif lenfadenopatiji incelemişler; MCL dışı kronik lenfoid malignensilerden sadece 3'ünde (%2,7) ve reaktif lenfadenopatilerin de hiçbirinde siklin D1 aşırı ekspresyonu bulamamışlardır (22). MCL'deki bu yaygın ve spesifik siklin D1 aşırı ekspresyonu, bu lenfomanın patogenezinde siklin D1 salınımindaki dengesizliğin önemli rol oynadığını kuvvetle düşündürmektedir. Daha önce yapılan çalışmalar MCL ve BCL-1 arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada da, MCL vakalarının %58'inde t(11;14) ya da BCL-1 tespit etmişlerdir. Siklin D1, t(11;14) translokasyonu ve BCL1 rearanjmanından bağımsız olarak da aşırı ekspresyon gösterebilmektedir (22). Karakteristik olmakla birlikte, t(11;14) translokasyonu sadece MCL'ya özgü değildir. Bazı diffüz büyük hücreli lenfomalar, kronik lenfositik lösemi ve multiple myeloma olgularında da izlenebilmektedir. Bazı araştırmacılar konuya netlik getirebilmek amacı ile "aşırı siklin D1 eksprese eden lenfoma" terimini kullanmayı önermişlerdir. Ancak, transgenik fare deneyleri sadece siklin D1 aşırı ekspresyonunun bu tür lenfoma gelişimi için yeterli olmadığını, birtakım ek genetik hadiselerin gerekli olduğunu ortaya çıkarmıştır (1). Konvansiyonel sitogenetik yöntemler ile MCL olgularının ancak yarısında t(11;14) translokasyonu gösterilebilmektedir. Southern blot ile olguların %50-70'inde BCL1 lokus rearanjmanları gösterilebilmektedir.

Kırılma noktalarının yaklaşık %30-40'ı kısa bir DNA segmenti üzerinde yer alır ve bu segmente “*major translocation cluster*” (MTC) adı verilir. t(11;14) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için iyi bir hedef olarak görünmekle birlikte, kullanılan primerlere bağlı olarak, bu metod ile MTC bölgesindeki rearanjmanların ancak %40–60'ı gösterilebilmektedir. Floresan in situ hibridizasyon (FISH), t(11;14) translokasyonunu göstermek için hem taze hem de parafin içindeki dokuda oldukça yüksek duyarlılıkla kullanılabilir. Northern blot yöntemi ile MCL olgularının %73'ünde siklin D1 mRNA'sı gösterilebilmiştir. Genetik yöntemlerle t(11;14)(q13;q32) translokasyonu gösterilemese dahi, parafinde çalışan antikolar yardımı ile hemen tüm MCL olgularında siklin D1 overekspresyonu olduğu izlenmiştir (23-31).

Son yapılan çalışmalarda doku yenilenmesinde ve embriyonik nörogenesisde bir transkripsiyon faktörü olan SOX11'in hem siklin D1 pozitif hem de siklin D1 negatif MCL'da aşırı ekspresyonu gösterilmiş ve bir MCL onkojeni olarak tanımlanmıştır. Fernandez ve arkadaşlarının çalışmasında 112 MCL olgusunda SOX11 çalışılmış ve %13 hastada SOX11'in negatif olduğu, bu olgularda hastalığın nodal tutulum olmaksızın seyrettiği ve prognozlarının daha iyi olduğu gösterilmiştir (32-34).

### **2.1.5. Patoloji**

Eldeki veriler, MCL gelişimine neden olan malign hücrelerin primer folliküllerde veya sekonder folliküllerin mantle zon kısmında yer alan hücrelerin neoplastik formları olduğunu desteklemektedir. Tipik morfolojisi, küçük ile orta boy arasında, irregüler nükleer konturu ve kaba kromatini olan hücrelerden oluşmaktadır. MCL, en sık olarak diffüz histolojide, daha seyrek olarak nodüler histolojide veya bu histolojilerin kombinasyonu şeklinde görülür. Nodüler varyantta mantle zondan merkeze doğru büyüme nedeni ile germinal merkezler oblitere olabilmekte ve bu görünüm folliküler lenfoma ile karışabilmektedir. Germinal merkezlerin kısmen korunduğu, malign hücrelerin follikül merkezini çevreleyen mantle zona sınırlı kaldığı mantle zon varyant, diğerlerine göre daha iyi seyri olduğu kabul edilmesi nedeni ile ayırt edilmeye çalışılmalıdır. Bunun aksine, hemen her zaman diffüz infiltrasyonla seyreden blastik varyant oldukça agresiftir, sıklıkla lösemik faz ve bazan SSS tutulumu ile birlikte (1).

Olguların yaklaşık %20'sinde neoplastik hücreler normalden büyüktür, daha ince kromatine ve küçük nükleollere sahiptir. "Blastik varyant" olarak adlandırılan bu tür olgular sıklıkla lösemik faz ile birlikte ve B hücreli lenfoblastik lenfoma ile karışabilir. Ancak, lösemik fazın blastik varyant dışında gelişebileceği de unutulmamalıdır. Bu tür olgular, kronik lenfositik lösemi ile karıştırılabilir. Bu durumda immünofenotipik özelliklerin dikkatle irdelenmesi faydalı olur (1).

### **2.1.6. İmmünofenotipik Özellikler**

MCL için karakteristik olan immünofenotipik bulgular CD5, CD20, CD43, siklin D1 ve FMC7 antijenlerinin ekspresyonudur. Lenfoma hücrelerinde CD10 ve CD23 genellikle negatiftir. Bazı vakalarda CD5 negatif ya da CD23 pozitif olabilir. Tanı şüpheliyse siklin D1 boyama ya da FISH ile t(11;14) bakılmalıdır. Malign lenfositlerde yüzeysel IgM ve IgD ekspresyonu vardır. Diğer B hücreli lenfomalarda genelde κ hafif zincir restriksiyonu izlenirken, MCL'da bunlardan farklı olarak λ hafif zincir restriksiyonu gözlenir (19).

### **2.1.7. Tanı**

MCL tanısı ideal olarak biyopsi ile elde edilmiş yeterli bir doku örneğinde konulmalı ve tanı immünofenotip paneli ile desteklenmelidir. Morfolojik, immünofenotipik ve genetik bulgularla desteklenmek kaydı ile periferik kan veya kemik iliği incelemesi ile de MCL tanısı konulabilir. Elde imkan varsa, tanı moleküler biyolojik yöntemler ile desteklenmelidir (1).

### **2.1.8. Evreleme**

Evrelemede Ann Arbor sistemi kullanılır.

Ann-Arbor evreleme sistemi:

Evre I: Tek lenf düğümü bölgesi ya da tek ekstralenfatik alan

Evre II: Diyafragmanın tek tarafında 2 ya da daha fazla lenf düğümü bölgesi ya da diyafragmanın tek tarafında lokal ekstralenfatik yayılımla birlikte bir ya da daha fazla lenf düğümü bölgesi

Evre III: Diyafragmanın her iki tarafında lenf düğümü bölgeleri

Evre IV: Eşlik eden lenf düğümü tutulumu olsun ya da olmasın bir ya da daha fazla ekstralenfatik organın yaygın tutulumu

E: Ekstranodal yayılım

X: Bulky kitle > 10 cm

A: Sistemik semptom yok

B: Son 6 ay içinde bazal vücut ağırlığının %10'undan daha fazlasının kaybı, yineleyen ve açıklanamayan 38°C'nin üzerindeki ateş, yineleyen gece terlemeleri

Kitlesel (bulky) hastalık: En büyük çapı 10 cm'nin üzerinde olan kitle ya da ön - arka akciğer grafisinde torakal 5-6 intervertebral disk düzeyinde hesaplanan en uzun transvers transtorasik çapın 1/3'ünü aşan mediastinal kitle (2,19).

### 2.1.9. Risk Sınıflaması

Prognostik değerlendirmede basitleştirilmiş “*Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index*” (MIPI) skorlaması kullanılmaktadır (35). Basitleştirilmiş MIPI skorunun parametreleri; yaş, “*Eastern Cooperative Group performance status*” (ECOG PS), LDH/normal LDH üst sınırı, beyaz küre (WBC) sayısıdır (Tablo 1).

**Tablo 1.** Basitleştirilmiş MIPI Skorlaması

Puanlar	Yaş (Yıl)	ECOG PS	LDH/LDHUL	WBC (10 <sup>9</sup> /L)
0	<50	0-1	<0,67	<6700
1	50-59	-	0,67-0,99	6700-9900
2	60-69	2-4	1,00-1,49	10000-14000
3	70	-	≥1,5	≥15000

ECOG PS: Eastern Cooperative Group performance status, LDH: Laktik dehidrogenaz, WBC: White blood cell, LDHUL: LDH upper level (LDH üst sınırı)

Her bir prognostik faktöre 0-3 arasında puan verilir. En fazla 11 puan hesaplanır. 0-3 puan alan hastalar düşük risk, 4-5 puan alan hastalar ara risk, 6-11 puan alan hastalar yüksek riskli olarak değerlendirilir (36).

### 2.1.10. Tedavi

Tedaviye ve tedavi şekline doğru bir evreleme yapıldıktan sonra karar verilmelidir. Evre I-II hastalarda küratif radyoterapi düşünülebilir. Ancak evre I-II olduğunu kesinleştirmek için endoskopi ve kolonoskopi yapılmalıdır (19).

Düşük oranda da olsa MCL indolen bir seyir gösterebilir. 97 hastalık bir seride %30 hastanın sadece gözlem ile tedavi almaksızın izlenebildiği ve ortalama 12 ay kadar tedavinin geciktirilebildiğine dair literatür bilgileri mevcuttur (37). İleri evre hastalıkta tedaviye başlamadan önce hastalar genç, performansı iyi, kök hücre nakli adayı olan hastalar ile ileri yaş, performansı düşük, kök hücre destekli yüksek doz kemoterapi alamayacak hastalar olarak ikiye ayrılmalıdır. Günümüzde genç ve performans skoru iyi olan hastalar için standart tedavi rituksimab ve kemoterapi kombinasyonu sonrası kök hücre destekli yüksek doz kemoterapidir. Ancak optimal indüksiyon rejiminin ne olduğu, nüks ve dirençli hastaların nasıl tedavi edilmesi gerektiği konusunda görüş birliği yoktur (38-40).

### 2.2. Rho Kinaz ve Rho Kinazın Tümör Oluşumuna Katkısı

Rho-kinaz bir serin/treonin protein kinazdır ve moleküler ağırlığı yaklaşık 160 kDa'dur. Rho-kinaz enziminin ROCK1 (ROCKI, p160ROCK, ROCK $\beta$ , ROK $\beta$ ) ve ROCK2 (ROCKII, ROCK $\alpha$ , ROK $\alpha$ ) olarak iki izoformu vardır. İnsanda ROCK1 ve ROCK2 genleri sırası ile 18. kromozom (18q11.1) ve 2. kromozomda (2p24) yer almaktadır. Rho-kinaz enziminin hemen hemen her dokuda varlığı gösterilmiştir; ancak, ROCK2'nin beyin ve kalpte, ROCK1'in akciğer, karaciğer, dalak, böbrek ve testiste daha fazla eksprese edildiği de bildirilmiştir (41).

Rho (*Ras-homologous*) GTPaz'lar, malign dönüşüm ve metastazla ilişkili bir çok hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Rho GTPaz'lar membranlarda lokalizedir ve hücre yüzey reseptörlerinin uyarılması ile aktive olurlar. Ayrıca, Rho guanin değişim faktörleri sıklıkla onkogeniktir ve malignensilerde Rho GTPaz'ların ekspresyonları sıklıkla artmıştır. Küçük GTPaz'ların Rho ailesi üyelerinin hücre siklus ilerlemesi, gen ekspresyonu ve apoptozisin yanı sıra aktin reorganizasyonu, hücre hareketi, hücre-hücre ve hücre ekstrasellüler matriks adezyonunun anahtar

düzenleyicileridir. Bu fonksiyonların her biri kanser gelişimi ve ilerlemesinde önem taşımaktadır. Rho proteinleri, antineoplastik ilaçlar ve iyonizan radyasyon gibi DNA hasarlanması oluşturan ajanlara karşı hücrel duyarlılığı da etkilemektedir. Böylelikle Rho ile indüklenen mekanizmalar geleneksel antineoplastik tedavinin terapötik etkililiğini ve/veya yan etkilerini değiştirmektedir.

G proteini ile ilişkili reseptörleri aktive eden çeşitli agonistlere yanıt olarak Rho aktive olmaktadır. Rho, sitoplazmada bulunan guanozin difosfat/guanozin trifosfat (GDP/GTP)-bağlayıcı bir proteindir ve guanozin trifosfataz (GTPaz) aktivitesi içerir. Rho proteinleri GDP-bağlı iken inaktif haldedirler. Rho aktivitesini kontrol eden başlıca üç protein bulunur.

- 1- GTPaz aktive edici proteinler (GAP): İntrinsik GTPaz aktivitesini artırarak Rho'yu inaktive ederler.
- 2- GTPaz disosiyasyon inhibitörleri (GDI): Rho GTPaz'ların nükleotid disosiyasyonunu ve membrana bağlanmasını önleyerek Rho aktivasyonunu inhibe eder.
- 3- Rho-spesifik guanin nükleotid değiş-tokuş faktörleri (GEF): GDP'nin disosiyasyonunu hızlandırarak Rho'yu aktive eder.

Rho, başlıca aktin hücre iskeletinin organizasyonunun düzenlenmesinde, hücre göçü, hücre adezyonu ve sitokinaz gibi çok çeşitli hücrel olayın kontrolünde rol oynar. Rho ailesinin üyelerinin, aktinin yeniden şekillenmesinde ve farklı yönlerinin düzenlenmesindeki rolü, ilk olarak fibroblast büyüme faktörü uyarısına yanıt çalışmaları ile açığa çıkarılmıştır (41-46). Büyüme faktörleri uyarımı sonucunda oluşan hücre iskeleti değişiklikleri arasında yüzey uzantılarının (filopodlar, lamellipodlar ve zar kıvrımları), fokal adezyonların ve stres liflerinin oluşumu yer alır. Daha sonraki çalışmalar, Rho ailesi üyelerinin fibroblastlarla sınırlı kalmadığını, bütün ökaryot hücre tiplerinde aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde benzer rol aldıklarını göstermiştir (45,46). Rho, sinir sistemi gelişimi sırasındaki akson uzama ve kısaltmalarını düzenler, düz kas hücrelerinin kasılmasının düzenlenmesine katılır, epitel hücrelerinde kaderinler ile aktin hücre iskeleti bağlantısını içeren adherens bağlantılarının oluşumunu düzenler. Bu yüzden Rho ailesi üyeleri, hücre dışı sinyaller ile hücre şekli, hareketi ve değişikliklerini ilişkilendiren aktin hücre iskeletinin genel düzenleyicileri olarak görev

yaparlar. Rho proteinlerinin hücre iskeleti değişikliklerinin düzenlenmesindeki anahtar hedeflerden birisi Rho-kinaz enzimidir. Hücreye Rho'yu aktive eden uyarılar geldiğinde veya Rho'nun aşırı ekspresyonu olduğunda Rho-kinaz sitoplazmadan membrana göç eder. Rho proteini GTP ile bağlandıktan sonra aktif hale gelir ve Rho-kinaz üzerindeki Rho bağlayan bölgeye bağlanarak enzimi aktive eder. RhoA'dan bağımsız olarak arakidonik asid ve sfingosinfosforilkolin, Rho-kinaza bağlanarak enzimi stimüle ederler (46-49). Statinler ise RhoA düzeylerini azaltarak Rho-kinaz aktivitesini inhibe ederler (42).

Pleotropik etkilerinden ötürü Rho proteinleri yeni antikanser ilaç gelişiminde ümit vaat edici ajanlar olarak görünmektedirler. Burada aslında önemli olan Rho ve beraberinde Ras proteinlerin C terminalinin izoprenilasyonudur ki bu proteinlerin hücre membranına bağlanıp aktif hale geçmesi, dolayısı ile onkojenik sinyali iletmesi için gereklidir. Dolayısıyla farnesil transferaz, geranilgeranil transferaz ve HMG-KoA-redüktaz inhibitörleri (statinler gibi) izoprenilasyonu önleyerek tümör tedavisinde faydalı olabilirler (42). Son yapılan çalışmalarda, Rho kinazların hiperaktivasyonunun diğer tirozin kinazlarla birlikte hematopoietik hücre transformasyonuna büyük bir katkı sağladığı gösterilmiştir. Rho kinazların, meme kanseri, kolorektal kanser, prostat kanseri olmak üzere çeşitli kanserlerde hiperaktif olduğu gösterilmiştir. Preklinik modellerde ROCK inhibitörlerinin özellikle metastaz olmak üzere tümörogenezi baskıladığı gösterilmiş olmakla birlikte, myeloproliferatif ve AML'deki rolleri ancak yeni ortaya çıkmaya başlamıştır (43).

Fasudil (HA-1077), Y-27632 ve H-1152P ya da dimetilfasudil en sık kullanılan Rho-kinaz selektif inhibitörleridir ve ATP ile yarışarak fonksiyon gösterirler. Bu ilaçlar ROCK1 ve ROCK2 için eşit etkinlik gösterirler ve fasudil, insanda kullanımı için onaylanmış tek Rho-kinaz inhibitörüdür (43).

### **2.3. Siklin D1 ile İlişkili Gen ve Proteinler**

Gen değişimleri, onkogenlerin aşırı ifade edilmesi ve hücre döngüsü düzenleyicileri tümör gelişiminde önemli rol oynayan faktörlerdendir (50). Bunlardan hücre

döngüsünün denetimi, çoğu biyolojik sürecin ve kansere yol açabilen kontrolsüz hücre çoğalmasının anlaşılmasında asıl ilgi odağı durumundadır. Hücre döngüsünü düzenleyen sistemlerin pek çok bileşeninin kanserle bağlantısı olduğundan kanser, bir hücre döngüsü düzensizlik hastalığı olarak da tanımlanabilir. G1, S, G2 ve M evrelerinden oluşan hücre döngüsünün bir evresinden diğerine geçişi, döngü basamağına göre düzeyleri artan ya da azalan siklin proteinleriyle denetlenir. Döngüde rolü olan pek çok onkogen ve tümör baskılayan gen, G1 kontrol noktasındaki hatalarla ilişkilidir (51). G1/S geçiş noktasının denetimi; siklinlerin sentezlerinin ve yıkımlarının denetlenmesi, kendisine bağlanan ve düzeyleri döngü boyunca değişmeyen ancak aktiviteleri denetlenen katalitik özgün kinazlarla birleşerek siklin-bağımlı kinaz (CDK) kompleksinin oluşumu, bu kompleksin otofosforilasyonla aktifleşmesi, Cip/Kip ve INK4/ARF gibi hücre döngüsü inhibitörlerinin etkisiyle inaktifleşmesi olaylarıyla sağlanır. D-tipi siklinler (siklin D1, D2 ve D3), CDK4 ve CDK6'yı aktive eder ve G1'in ilerleyişinden sorumludur (52-55).

Retinoblastoma (Rb), hücre döngü düzenleyicisi ve tümör baskılayıcısı olarak belirlenen genlerden biridir. Siklin ile oluşan CDK4 ve CDK6 kompleksleri Rb proteinlerini fosforile ederek onu inaktive eder. İnaktif Rb, aktifken kendisine bağlı olan transkripsiyon uzama faktörü-2 (E2F)'yi serbest bırakır. E2F de, G1/S geçişi ve S evresine giriş için gerekli (siklin A, E ve CDK1, myb, dihidrofolat redüktaz, timidin kinaz gibi) genlerin ifade edilmesini sağlar. E2F, diğer döngü düzenleyicileri gibi DNA sentezi, DNA onarımı ve apoptoz olaylarında rol oynamakta ve bazı tümörlerde allele bağlı ifade edilme düzensizliklerine neden olabilmektedir. G1 düzenleyicilerinden siklin D1, CDK4 ve p16, over kanser gelişiminde önemli rol oynarlar. Miktarı artan siklin D1, Rb proteinini fosforilasyonla inaktive etmek için CDK4 ve CDK6 ile birleşir. Siklin D1'in ifade edilmesinin, bazı hücre tiplerinde hücre-hücre dokunmasının ortadan kalkmasıyla azaldığı ve bu döngü düzenleme etkisinin integrinler ve fokal adezyon kinazlar aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir (56-59). Meme, özefagus, squamöz hücreli kanser ve mantle hücreli lenfomada siklin D1 lokusunda artış olduğu gözlenmiştir (23,25,60,61).



#### 2.4. p53

p53, 17. kromozomun kısa kolu üzerinde yaklaşık 20 kb'lık bir alana yayılmış 11 ekzondan oluşan bir gen tarafından kodlanmaktadır (62). p53 proteini DNA tamiri, hücre döngüsünün kontrolü, genomik kararlılığın sağlanması, kromozom ayrılmasının düzenlenmesi, gen ifadesinin düzenlenmesi, yaşlanma ve programlı hücre ölümü gibi birçok hücresel olayda rol almaktadır. p53, bu işlevlerini ya transkripsiyon faktörü olarak ilgili genlerin transkripsiyonlarını düzenleyerek ya da diğer proteinler ile veya doğrudan DNA ile fiziksel olarak etkileşerek gerçekleştirmektedir. p53, hücre döngüsünün G0/G1 evresinde rol alan birçok siklin bağımlı kinazın işlevini engelleyen p21 proteininin ifadesini, p21WAF2/Cip1 geninin transkripsiyonunu uyararak düzenlemekte ve böylece p21 proteini aracılığı ile hücre döngüsünü G1 aşamasında durdurmaktadır. p53 ayrıca, mitoz bölünme için gerekli proteinleri kodlayan c-myc ve c-fos gibi genlerin transkripsiyonlarını düzenleyen E2F transkripsiyon faktörü ile fiziksel olarak etkileşerek hücre döngüsünün G2 evresinde durdurulmasında da rol almaktadır (7-10).

#### 2.5. p63

p63 proteini yapısal ve işlevsel olarak p53'e oldukça benzer bir proteindir ve 3q27 kromozom bölgesinde yerleşik bir gen tarafından kodlanmaktadır (11). *In vitro* gerçekleştirilen DNA bağlanma çalışmaları ile p63'ün p53 tarafından transkripsiyonları düzenlenen p21, mdm2, bax, PERP, NOXA ve protein 14-3-3σ genlerinin promotörlerine bağlanarak bu genlerin transkripsiyonlarını düzenlediği gösterilmiştir. p63, p53'ten farklı olarak "*Steril Alpha Motif*" (SAM) diye adlandırılan ve yalnızca p63'ün α formlarında (Tap63α, ΔNp63α) bulunan bir bölge içermektedir. SAM bölgesi bulunduran diğer proteinler ile birlikte düşünüldüğünde, bu bölgenin programlı hücre ölümü, transkripsiyonel transaktivasyon, fokal adezyon, kromatin yeniden-şekillendirilmesi ve reseptör tirozin kinaz uyarılması gibi hücresel işlevlerde rol alabileceği akla gelmektedir. Bir çalışmada, *Drosophila* embriyolarında morfojen gradiyenti oluşumunda rol alan ve SAM bölgesi içeren Smaug proteininin nanos

mRNA'sının 3'-UTR bölgesine bağlanarak translasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. SAM bölgesine yönelik diğer bulgular ve p63 çalışmaları, bu bölgenin organizmanın gelişim dönemindeki protein-protein etkileşimlerinden sorumlu olduğunu ve p63'ün öncelikli görevinin de gelişim döneminde ektodermal farklılaşmanın ve epitelyal projenitör hücrelerin devamlılığını sağlamak olduğunu önermektedir. p53'ten yoksun (p53<sup>-/-</sup>) farelerde gerçekleştirilen çalışmalar, bu farelerin gelişimsel olarak normal olduklarını ancak neoplastik hastalıklara yatkın olduklarını göstermiştir. p63'ten yoksun (p63<sup>-/-</sup>) fareler ise deri, prostat, süt bezleri ve üretelia gibi epitel dokular ve dudak gelişimi gibi gelişimsel anomaliler ile doğmuşlar ve doğduktan kısa bir süre sonrada ölmüşlerdir. p63'ten yoksun farelerin dudakları ya yoktur ya da kırpıktır, derileri gelişimin erken bir evresinde kalmakta differansiyasyon markırları eksprese etmemektedir. Saç follükülleri, diş ve meme bezleri gibi epidermal-mezenşimal etkileşim bağımlı gelişen yapılar, p63'ten yoksun farelerde yoktur. Bu durum, p53'ün aksine p63'ün embriyogenez sırasında ektodermal farklılaşma için gerekli olduğunu önermektedir (63-67).

## **2.6. Ki-67**

Ki-67 patolojide sık kullanılan özellikle tümörlerde prognostik değeri araştırılan bir proliferasyon belirleyicisidir. Ki-67 proliferasyon indeksinin %30'dan az olması iyi prognozla ilişkilidir. Yüksek bir Ki-67 proliferasyon indeksi ya da p53 mutasyonu, p16 delesyonu blastoid daha agresif MCL subtipleriyle yakından ilişkilidir (12,19,36).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

#### **3.1. Hasta ve Kontrol Grubu**

2006-2012 yılları arasında, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı ve Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda MCL tanısı konmuş 60 hastanın doku örnekleri ve kontrol grubu olarak, herhangi bir nedenle lenf nodu veya doku biyopsisi alınmış, ancak herhangi bir malign hastalık teşhisi konmamış, reaktif hiperplazi olarak Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı tarafından raporlanmış 60 sağlam yetişkinin doku örnekleri etik kurul onayı alınarak (03.04.2012/143) retrospektif olarak incelendi. Hastaların ilk tanı tarihindeki klinik ve laboratuvar bilgileri kaydedildi, genel sağkalım süreleri ise tanı tarihinden itibaren ölüm ya da hastanın en son görüldüğü tarihe kadar hesaplandı.

#### **3.2. Örneklerinin Alınması, Saklanması ve İncelenmesi**

Hematoksilen ve eozin boyalı tüm arşiv preparatları tekrar değerlendirilerek immunhistokimya ve PCR çalışması için seçildi. Çalışmalar Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ve Genetik laboratuvarlarında yapıldı.

#### **3.3. Dokuların Hazırlanması**

Dokular %10 formalin solüsyonlarında 24 saat fikse edildi. 6-7 mm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler otomatik takip makinesine (Leica ASP 300, Leica Microsystems, ABD) alınarak alkol, ksilen ve parafin içerisinde geçirildi. Daha sonra kesitler parafin blok içerisine gömüldü. Parafin bloktan Leica RM 2145 model mikrotomla 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak ışık mikroskopunda değerlendirmek amacıyla hematoksilen ve eozin boyaması yapıldı.

#### **3.4. Boyasız Kesitler ve Deparafinizasyon**

İlk olarak hematoksilen-eozin boyalı preparatlar incelenerek uygun blok seçimi yapıldı ve Leica RM 2145 model mikrotomla 4 mikron kalınlığında boyasız kesit elde

edildi. Tüm boyasız kesitler “*polysine*” kaplı adezivli lamlara alındı. 65°C’de 15 dk etüvde bekletilerek dokuların lamlara yapışması sağlandı. Daha sonra lamalar ksilende yaklaşık 10 dk bekletilerek deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi.

### 3.5. İmmünohistokimyasal Boyama

Retrospektif olarak patoloji arşivinden seçilen MCL olgularının uygun parafin bloklarından mikrotom ile 4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Etüvde 60°C’de ısıtılarak ve daha sonra ksilol solüsyonları ile deparafinize edildi. İmmünperoksidaz yöntemi ile immünohistokimyasal boyama, DAB yöntemi ile renklendirme LEICA BOND-MAX otomatik boyama cihazı ile yapıldı. Primer antikorlar olarak ROCK1 (Rabbit monoclonal, EP786Y, ab45171, Abcam, Cambridge, İngiltere), ROCK2 (Rabbit polyclonal, ab71598, Abcam, Cambridge, İngiltere), p53 (Neo markers, Sino Biological, Çin), p63 (Cell marque, Ventana, California, ABD) ve Ki-67 (Neo markers, Sino Biological, Çin) kullanıldı. Kontrol grubunun preparatları da ROCK1 ve ROCK2 için aynı yöntemlerle boyandı.

İmmünohistokimyasal boyama aşağıdaki protokole göre yapıldı:

- 1- İlk olarak adezivli lamlara alınan dokulardaki antijenite daha belirgin hale getirildi. Bunun için konsantre ‘Citrat buffer 9003’ solüsyonunu 1/10 oranında distile su ile sulandırıldı. Kontrol ve çalışma lamaları hazırlanan bu solüsyonun içerisine konularak mikrodalga fırında 5’er dakikalık periyotlarla toplam 20 dakika yüksek ısıya tabi tutuldu. Periyotlar arasında solüsyonun eksilmemesine özen gösterildi.
- 2- Bundan sonra tatbik edilecek maddeleri (özellikle primer antikorları) dokuların üzerinde dağıtmadan tutmak amacı ile dokuların etrafı antikor kalemi ile işaretlendi. Bu arada oda ısısı 22°C olacak şekilde ayarlandı.
- 3- Daha sonra lamalar boyama işleminin yapılacağı plastik kaplar üzerine dizilerek üzerine pH 7,2 olan fosfat tamponu (PBS) damlatıldı ve 5 dakika bekletildi.
- 4- PBS uzaklaştırılarak 5 dakika pepsin ile muamele edilip, bu süre bitiminde tekrar PBS ile yıkandı.
- 5- Pepsin tatbik edildikten sonra dokular üzerine primer antikorlar damlatılıp 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda da dokular yine PBS ile yıkandı.

6- Bu aşamada preparatlara LSAB-2 HRP sistemi uygulandı. İlk olarak 'large volume biotinylated goat anti-polyvalen' 10 dakika uygulandı ve bu süre sonunda tekrar PBS ile yıkandı. Daha sonra 'large volume streptavidin peroxidase' yine 10 dakika uygulanarak preparatlar PBS ile yıkandı.

7- Bu aşamada ise 1 ml 'Dab substrate' içerisine 2 damla 'Dab chromogen' olacak şekilde hazırlanan kromojen 20 dakika süre ile uygulandı. Bu aşamadan sonra preparatlar çeşme suyunda yıkandı.

8- Preparatlar yaklaşık 60 sn hematoksilin ile boyandıktan sonra tekrar çeşme suyunda yıkandı. Normal histokimyada olduğu gibi alkol ve ksilen serilerinden geçirilerek entellan ile kapatıldı.

### **3.6. Histopatolojik Skorlama**

Işık mikroskopisi ile incelenerek yaygın saha boyaması olan preparatlar değerlendirmeye alınıp skorlamada tümör hücrelerindeki boyanma oranına göre ROCK1, ROCK2, p63 ve p53 için boyanma olmayan (0), hafif boyanma (1), orta boyanma (2), kuvvetli boyanma (3) olarak değerlendirildi. Her örnek için, randomize seçilen x40'lık objektifte 1000 hücre sayıldı, Ki-67 ile pozitif boyanan hücreler total hücre, tümör hücre sayısına bölünerek (1000 hücre), her olgu için Ki-67 proliferatif indeksi hesaplandı ve sonuçlar % olarak ifade edildi.

### **3.7. DNA İzolasyonu**

Parafin bloklardan DNA izolasyonu Qiamp DNA FFPE tissue kit (kat.no. 56404) kullanılarak DNA eldesi yapıldı. Elde edilen DNA UV spektrofotometre (Epoch Biotek, ABD) ile ölçülerek çalışmaya hazırlandı.

### **3.8. PCR ile Gen Polimorfizminin Araştırılması**

Çalışmada ROCK1 ve ROCK2 enzimini kodlayan gen bölgesindeki çeşitli tek nükleotid değişimi araştırıldı.

Projede araştırılan ROCK1 geni ile ilgili tek nükleotid polimorfizmlerinin referans SNP numaraları şunlardır: rs111874856, rs112108028, rs35996865, rs1045144 ve rs112130712.

Projede araştırılan ROCK2 geni ile ilgili tek nükleotid polimorfizmlerinin referans SNP numaraları şunlardır: rs2290156, rs965665, rs10178332, rs2230774 (Thr431Asn), rs2230774 (Thr431Ser), rs6755196 ve rs726843.

Her SNP bölgesi için taqman primer prop tasarımı yapıldı. Elde edilen DNA'lardan Biomark HD (Fluidigm, ABD) cihazı ile floresan PCR yöntemi kullanılarak erime eğrisi analizi yapıldı. Yine bu cihazda her bir SNP için genotipleme yapıldı.

### **3.9. İstatistiksel Analiz**

Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma (S.D.) veya yüzde olarak ifade edildi. Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (SPSS Inc., versiyon 17.0, Chicago, IL, ABD) ve GraphPad InStat versiyon 3.05 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ABD) programları kullanıldı. İki grup ortalamalarının karşılaştırılmasında eşleşmemiş Student t-testi, yüzdelerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi uygulandı. İki'den fazla grup ortalamalarının karşılaştırılmasında ANOVA ve sonrasında Student-Newman-Keuls testi kullanıldı. İki'den fazla grupların skor karşılaştırması için Kruskal-Wallis testi uygulandı. Genotip dağılımı ve allel sıklıkları gruplar arasında Ki-kare testi (Yate's düzeltmesi ile) veya Fisher'in kesin Ki-kare testi kullanılarak karşılaştırıldı. Korelasyonlar, Pearson korelasyon testi ile değerlendirildi. İmmünohistokimyasal olarak ekspresyonlarının kontrol grubuna göre karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Tüm istatistik testlerde P değeri iki yönlüydü ve 0.05'den az olan P değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### Hastaların ve Kontrol Grubunun Klinik Özellikleri

Hastaların ve kontrol grubunun klinik özellikleri Tablo 2’de özetlenmiştir.

**Tablo 2.** Çalışma popülasyonunun klinik özellikleri

	Hasta (n=60)	Kontrol (n=60)	P
Yaş (yıl) <sup>a</sup>	61.9±10.9	58.6±10.4	0.0910
Cinsiyet			
Erkek (n, %)	42 (70,0)	37 (61,7)	
Kadın (n, %)	18 (30,0)	23 (38,3)	0.4413

<sup>a</sup>Veriler: ortalama ± S.D.

MCL hastalarının yaş ortalaması 61.9±10.9 yıl, kontrol grubunun yaş ortalaması 58.6±10.4 yıldır. Hasta ve kontrol grubunun yaş ortalaması arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktur.

MCL hastalarının %70’i erkek, %30’u kadın; kontrol grubunun %61,7’si erkek, %38,3’ü kadın olup, hasta grubu ile kontrol grubu arasında cinsiyet dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

MCL hastalarının demografik özellikleri Tablo 3’de özetlenmiştir.

**Tablo 3.** MCL hastalarının demografik özellikleri

Doku Örneği	n (%)	Evre*	n (%)	Kemoterapi Protokolü	n (%)
LAP	30 (50)	I-II	4 (6,6)	R-CHOP	26 (68,4)
Ağız mukozası	1 (1,6)	III-IV	56 (93,4)	R-HIPERCVAD	6 (15,7)
Kemik İliği	13 (21,6)			R-CVP	3 (7,89)
Mide	6 (10)			R-CEOP	2 (5,26)
Tonsil	4 (6,6)			R-FCM	1 (2,63)
Orbital kitle	1 (1,6)			Toplam	38 (63,3)
Rektum	2 (3,3)				
Nazofarenks	3 (5)				
Ortalama Sağkalım	Ay	Tedaviye Yanıt	n	Ortalama Kür Sayısı	n
Kadın	22,8	CR	15	R-CHOP	5,5
Erkek	21,7	PR	7	R-HIPERCVAD	3,2
Total	22,1	REFR	12	R-CVP	5,3
		RLPS	20	R-CEOP	3,5
				R-FCM	1

CR: Tam remisyon, PR: Parsiyel Yanıt. REFR: Refrakter. RLPS: Relaps LAP: Lenfadenopati

R-CHOP: Rituximab, cyclophosphamide, hydroxydaunorubicin (doxorubicin/adriamycin), oncovin (vincristine), prednisone

R-CVP: Rituximab, cyclophosphamide, vincristine, and prednisone

R-HIPERCVAD: Rituximab, cyclophosphamide, vincristine, adriamycin (doxorubicin), dexamethasone, alternating with methotrexate and cytarabine

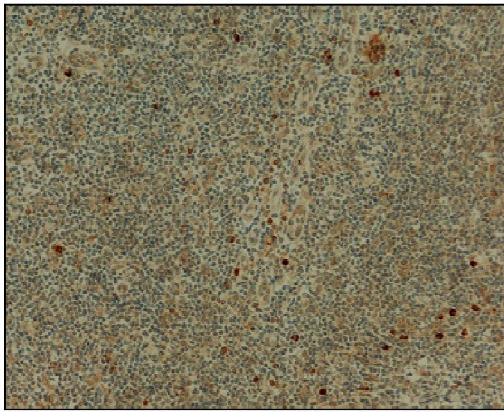
R-FCM: Rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, methotrexate

\* Evreleme Ann Arbor evreleme sistemine göre yapıldı.



### İmmünohistokimyasal Boyanma

İmmünohistokimyasal olarak hastaların ve kontrol grubunun doku örnekleri ROCK1, ROCK2, p53, p63, Ki-67 antikorları ile boyandı ve incelendi (Resim 1-4). Hasta ve kontrol grubunun sonuçları karşılaştırıldı. Ayrıca hastaların sonuçları prognostik faktörleri ile de karşılaştırıldı.



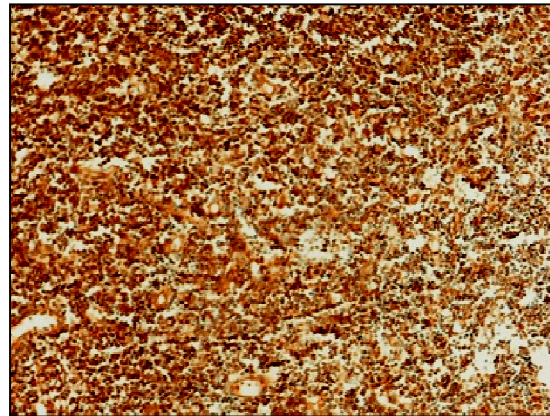
(A) Kontrol grubu lenf nodülü ROCK1 ile boyanması (skoru 0-1).



(B) MCL hastasının lenf nodülü biyopsisi ROCK1 ile boyanması (skoru 3).



(C) Kontrol grubu lenf nodülü ROCK2 ile boyanması (skoru 0-1).

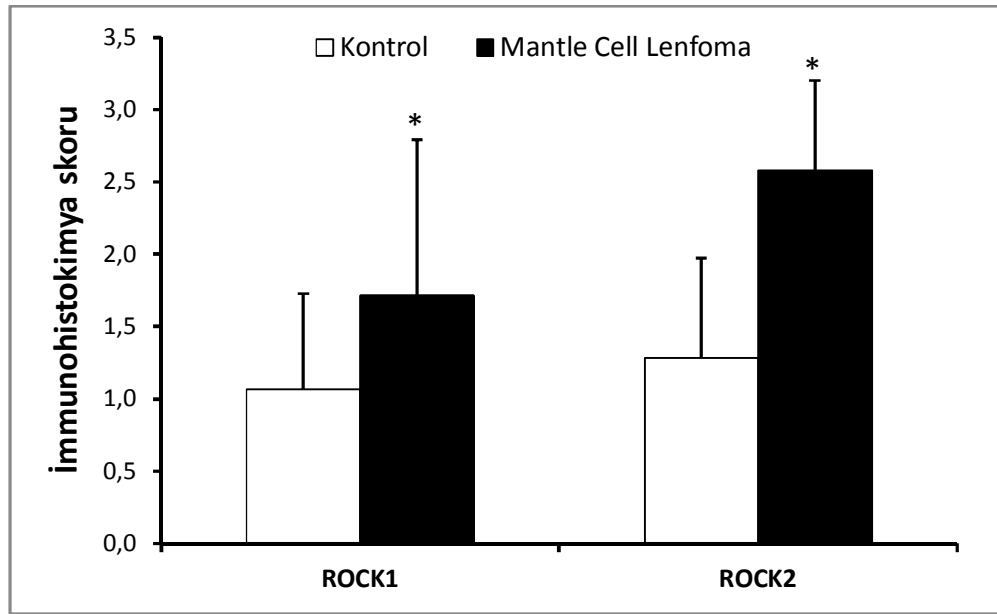


(D) MCL hastasının lenf nodülü biyopsisi ROCK2 ile boyanması (skoru 3).

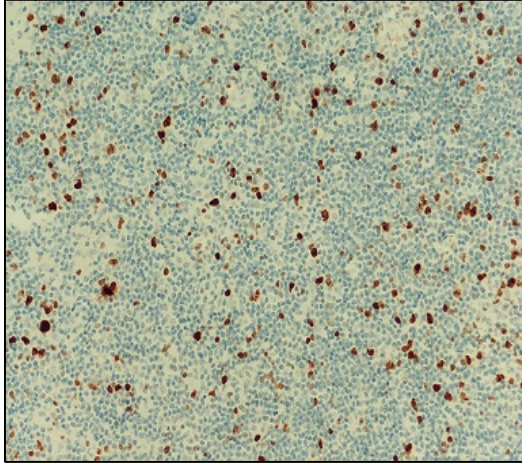
**Resim 1.** MCL ve kontrol grubunun ROCK1 ve ROCK2 antikorları ile immunohistokimyasal boyanması (Büyütme: x200).

ROCK1 ve ROCK2 immunohistokimyasal boyanması hasta grubunda belirgin olarak fazlaydı (Resim 1).

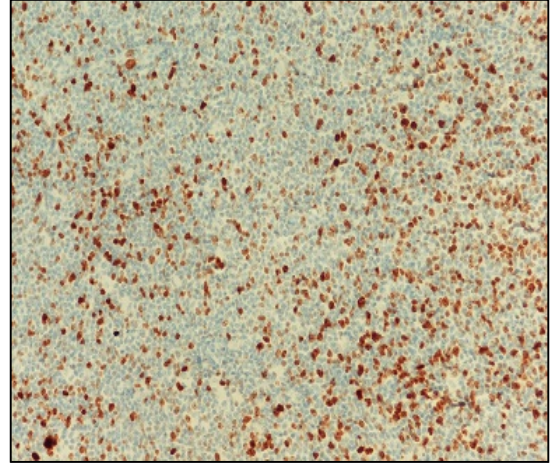
Hasta ve kontrol grubunda ROCK1 ve ROCK2'nin immunohistokimyasal skoru Şekil 1'de karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta grubunda hem ROCK1 ( $P=0.0009$ ) hem de ROCK2 skorları ( $P<0.0001$ ) anlamlı olarak artmıştı. Kontrol grupları arasında skor açısından her iki grupta fark yoktu ( $P=0.1743$ ). Fakat, hasta grubunda ROCK2 skoru ROCK1'e göre anlamlı olarak artmıştı ( $P<0.0001$ ).



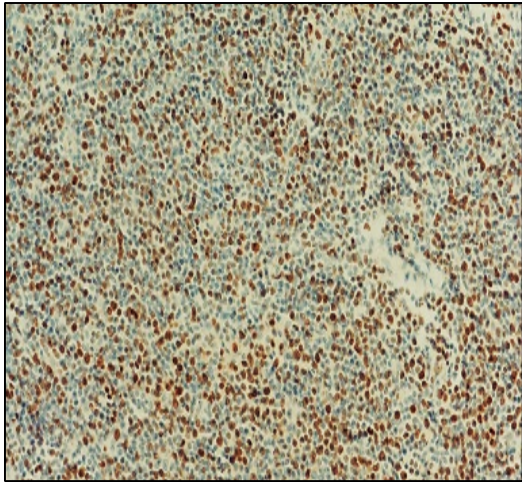
**Şekil 1.** MCL hasta ve kontrol grubundaki ROCK1 ve ROCK2 immunohistakimya skorları.



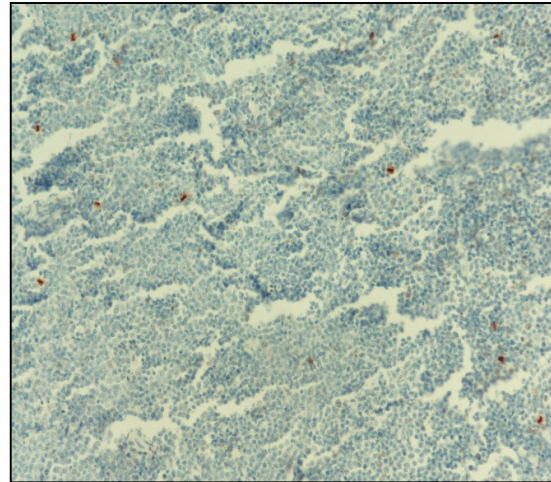
(A) MCL hastasının lenf nodu Ki-67 boyanması (%3'lük boyanma).



(B) MCL hastasının lenf nodu Ki-67 boyanması (%40'lık boyanma)



(C) MCL hastasının lenf nodu Ki-67 boyanması (%70'lik boyanma).



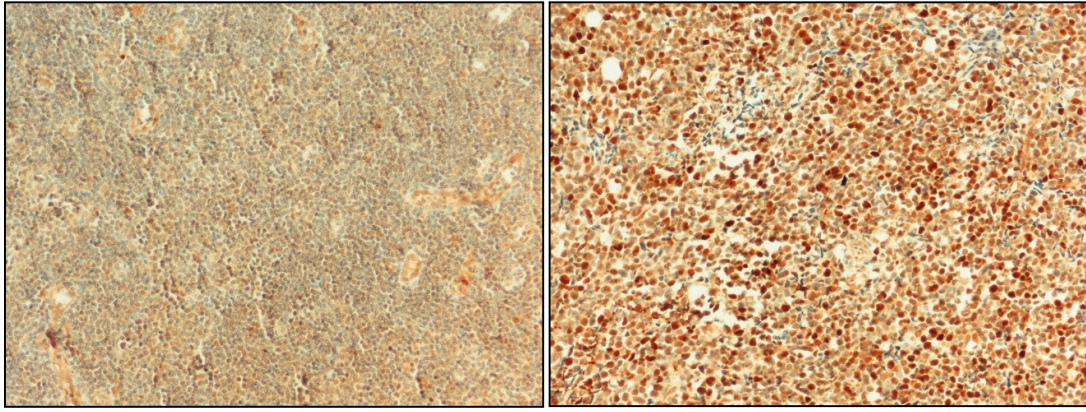
(D) Kontrol grubu lenf nodülü Ki-67 boyanması (%1'lik boyanma).

**Resim 2.** MCL ve kontrol grubunun Ki-67 ile immunohistokimyasal boyanması (Büyütme: x200).

Kontrol grubunda Ki-67 ile boyanma belirgin değilken, hasta grubunda %1 ile %90 arasında değişen oranlarda boyanmalar saptandı (Resim 2).



Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta grubunda p53 boyanma skoru artmıştı (Resim 3).

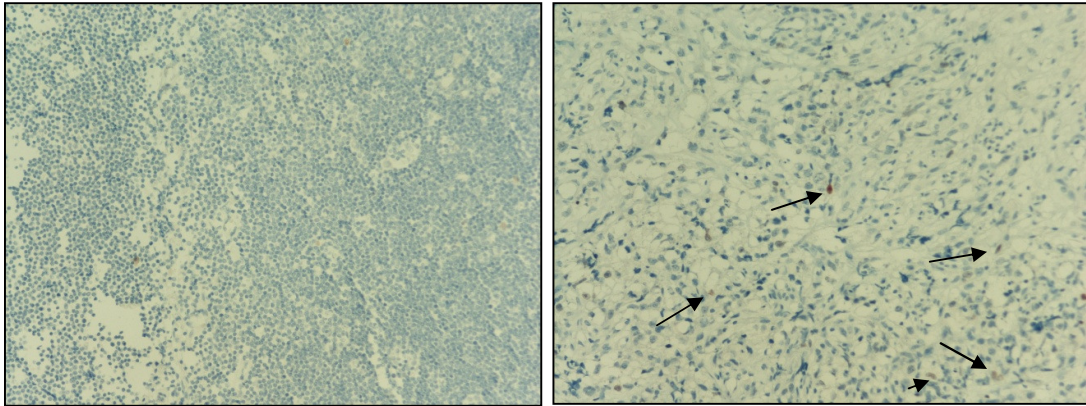


(A) Kontrol grubu lenf nodülü p53 boyanması (skor: 0)

(B) MCL hastasının lenf nodülü biyopsisi p53 ile boyanması (skoru 3).

**Resim 3.** MCL ve kontrol grubunun p53 ile immunohistokimyasal boyanması (Büyütme: x200).

Hasta örneklerinde p63 ile sadece bir vakada nükleer boyanma görüldü, reaktif lenfadenopatilerde ise p63 ile hiçbir örnekte boyanma yoktu (Resim 4).



(A) Kontrol grubu lenf nodülü p63 boyanması (negatif)

(B) MCL hastasının lenf nodülü p63 ile boyanması (pozitif, ok işaretleriyle gösterilmiştir).

**Resim 4.** MCL ve kontrol grubunun p63 ile immunohistokimyasal boyanması (Büyütme: x200).

**Tablo 4.** MCL hastalarında prognostik faktörlerin korelasyon analizi ile karşılaştırılması (istatistiksel olarak anlamlı olanlar).

Prognostik faktörler	Korelasyon Katsayısı (Correlation coefficient) (r)	Belirtme Katsayısı (Coefficient of determination) (r <sup>2</sup> )	P değeri
Yaş ↔ Sağkalım	-0.421	0.177	0.001
Yaş ↔ ROCK1	0.260	0,067	0.044
Yaş ↔ MIPI skoru	0.667	0,444	<0.0001
Yaş ↔ Transplantasyon	-0.471	0,221	<0.0001
Toplam sağ kalım süresi ↔ Kür sayısı	0.463	0,214	0.008
CD20 ↔ CD79a	0.443	0,196	<0.0001
CD79a ↔ Trombosit sayısı	-0.282	0,079	0.045
LDH ↔ MIPI skoru	0.601	0,361	<0.0001
LDH ↔ Sağkalım	-0.294	0,086	0.041
LDH ↔ p53	0.305	0,093	0.033
LDH ↔ Ki67	0.375	0,140	0.008
MIPI skoru ↔ Transplantasyon	-0.390	0,152	0.006
MIPI skoru ↔ Sağkalım	-0.426	0,181	0.002
MIPI skoru ↔ p53	0.357	0,127	0.012
MIPI skoru ↔ Ki67	0.289	0,083	0.044
Kür sayısı ↔ ROCK1	-0.394	0,155	0.026
Kür sayısı ↔ ROCK2	-0.456	0,207	0.009
Transplantasyon ↔ Sağkalım	0.363	0,131	0.004
p53 ↔ Ki67	0.522	0,272	<0.0001
ROCK1 ↔ ROCK2	0.559	0,312	<0.0001

Yaş ile transplantasyon ve sağkalım, MIPI skoru ile sağkalım ve transplantasyon, kemoterapi kür sayısı ile ROCK1 ve ROCK2, LDH ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon vardı. Yaş ile ROCK1 ve MIPI skoru, toplam sağ kalım süresi ile kemoterapi kür sayısı, CD20 ile CD79a, LDH ile MIPI skoru, p53 ve Ki-67, transplantasyon ile sağkalım, p53 ile Ki-67, ROCK1 ile ROCK2 arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon vardı (Tablo 4).

MCL hastalarında, cinsiyet, toplam sağ kalım süresi, biyopsi yeri, evre, CD20, CD79a, LDH, MIPI skoru, transplantasyon, sağkalım, p53, Ki-67 ile ROCK1 ve ROCK2 arasında, ayrıca yaş ile ROCK2 arasındaki korelasyonlar incelendi ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı (Tablo 5).

**Tablo. 5:** MCL hastalarında prognostik faktörlerle Rho-kinaz arasındaki korelasyonlar (istatistiksel olarak anlamsız olanlar).

Prognostik faktörler	Korelasyon Katsayısı (Correlation coefficient) (r)	Belirtme Katsayısı (Coefficient of determination) (r <sup>2</sup> )	P değeri
Cinsiyet ↔ ROCK1	0,038	0,001	0,776
Cinsiyet ↔ ROCK2	-0,148	0,021	0,258
Yaş ↔ ROCK2	0,121	0,014	0,357
Toplam sağ kalım süresi ↔ ROCK1	-0,176	0,030	0,180
Toplam sağ kalım süresi ↔ ROCK2	-0,197	0,038	0,131
Biyopsi yeri ↔ ROCK1	0,044	0,001	0,741
Biyopsi yeri ↔ ROCK2	0,122	0,014	0,359
Evre ↔ ROCK1	-0,142	0,020	0,314
Evre ↔ ROCK2	-0,029	0,000	0,840
CD20 ↔ ROCK1	0,203	0,041	0,120
CD20 ↔ ROCK2	-0,008	0,000	0,950
CD79a ↔ ROCK1	0,155	0,024	0,236
CD79a ↔ ROCK2	0,005	0,000	0,971
LDH ↔ ROCK1	-0,085	0,007	0,560
LDH ↔ ROCK2	-0,032	0,001	0,827
MIPI skoru ↔ ROCK1	0,168	0,028	0,248
MIPI skoru ↔ ROCK2	0,125	0,015	0,391
Transplantasyon ↔ ROCK1	-0,098	0,009	0,455
Transplantasyon ↔ ROCK2	0,162	0,026	0,216
Survival ↔ ROCK1	0,047	0,002	0,722
Survival ↔ ROCK2	-0,027	0,000	0,837
p53 ↔ ROCK1	0,047	0,002	0,723
p53 ↔ ROCK2	0,098	0,009	0,457
Ki67 ↔ ROCK1	0,057	0,003	0,665
Ki67 ↔ ROCK2	0,179	0,032	0,172

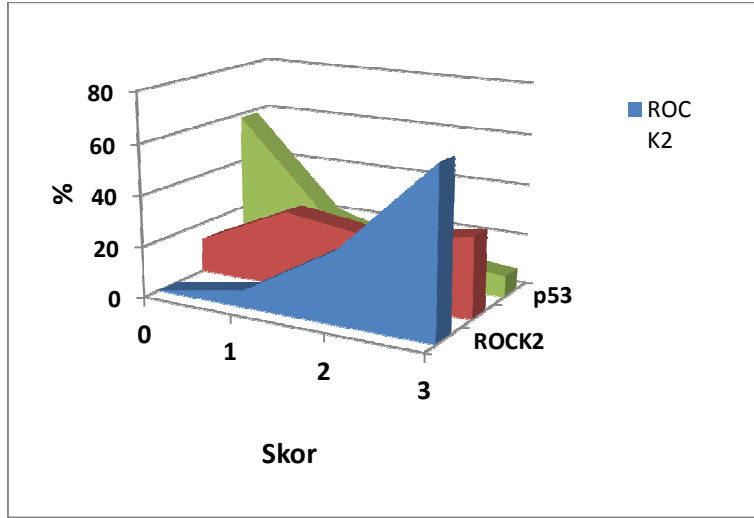
MCL hastalarında ROCK2 ekspresyonu ROCK1 ve p53'e göre anlamlı artmıştır (Tablo 6).

**Tablo 6.** MCL hastalarında ROCK1, ROCK2, P53'ün immünohistokimyasal boyanma özellikleri.

İmmünohistokimyasal Skor	ROCK1	ROCK2	p53
	n (%)	n (%)	n (%)
0	8 (13,3)	0 (0)	35 (58,3)
1	18 (30)	4 (6,6)	13 (21,6)
2	15 (25)	17 (28,3)	7 (11,6)
3	19 (31,6)	39 (65)	5 (8,3)

ROCK1-ROCK2: P<0.0001, ROCK1-p53: P<0.0001, ROCK2-p53: P<0.0001

İmmünohistokimyasal olarak ROCK2'de ROCK1 ve p53'e göre daha kuvvetli boyanma görülmüştür (Şekil 2).



**Şekil 2.** MCL hastalarında ROCK1, ROCK2, P53'ün immünohistokimyasal boyanma oranları.

Ki-67 proliferasyon indeksi gruplara ayrılıp, yaş ortalaması, ortalama LDH, ROCK1 ve ROCK2 ile ilişkisine bakıldığında ikinci grupta üçüncü grup arasında ortalama LDH düzeyleri arasında anlamlı fark görülmüştür (Tablo 7).

**Tablo 7.** MCL hastalarında Ki-67'nin sınıflandırılması, prognostik faktörler ve toplam sağkalımla ilişkisi

	<b>Ki-67 (%)</b>	<b>Hasta sayısı n (%)</b>	<b>Yaş Ortalaması (Yıl)</b>	<b>Ortalama LDH (U/L)</b>	<b>Ortalama Sağ kalım (Ay)</b>	<b>ROCK1 skoru</b>	<b>ROCK2 skoru</b>
<b>Grup I</b>	≤30	38 (63,3)	63,3±10,4	346,4±206,5	19,4±19,4	1,7±1,1	2,5±0,6
<b>Grup II</b>	31-60	11 (18,3)	57,2±9,9	264,6±62,0	29,8±17,8	1,6±1,0	2,6±0,7
<b>Grup III</b>	≥61	11 (18,3)	62,00±13,2	688,6±381,2*	23,5±17,3	1,8±1,0	2,8±0,4

\*P<0.001 Grup I ve Grup II ile karşılaştırıldığında

Yaş Ortalaması: P=0.2693, Ortalama LDH: P=0.0002, Ortalama Sağ kalım: P=0.2684

ROCK1 skoru: P=0.9128, ROCK2 skoru: P=0.3943

Otolog kemik iliği transplantasyonu olan hastalarla olmayanlar karşılaştırıldığında yaş ortalaması arasında anlamlı fark varken ortalama sağ kalım açısından anlamlı fark görülmemiştir (Tablo 8).

**Tablo 8.** Otolog kemik iliği transplantasyonu ile toplam sağ kalım arasındaki ilişki

	<b>n (%)</b>	<b>Yaş ortalaması (Ay)</b>	<b>Toplam sağ kalım (Ay)</b>
<b>OKİT</b>	7 (11,6)	47,9±9,5	29,6±17,7
<b>Nakil Olmayanlar</b>	53 (88,3)	63,8±9,8*	21,1±19,0

OKİT: Otolog kemik iliği transplantasyonu

Yaş ortalaması: P=0.0001, Toplam sağ kalım: P=0.2684



Tedavi yanıtı CR ve PR olan hastalarla refrakter olan hastalar karşılaştırıldığında yaş ortalaması, MIPI skoru, ROCK1 ve ROCK2 ekspresyonu, ortalama sağ kalım süreleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir, ancak refrakter olan grupta Ki-67 oranı CR ve PR'da olan gruba göre anlamlı olarak artmıştı (Tablo 9).

**Tablo 9.** Tedaviye yanıtın MIPI skoru, ROCK1 ve ROCK2 protein ekspresyonu ile ilişkisi

	n	Yaş Ortalaması (Yıl)	MIPI skoru	ROCK1 skoru	ROCK2 skoru	Ki-67 (%)	Toplam sağkalım süresi (ay)
CR+PR	22	60.1±12.8	6.0±0.7	1.4±1.0	2.4±0.7	22.4±26.4	26.4±18.1
REFR	12	64.7±8.6	6.5±0.9	2.0±1.3	2.8±0.4	44.8±35.7	21.8±14.8
P değeri		0.2787	0.1669	0.1198	0.0881	<b>0.0445</b>	0.4646

CR: Tam remisyon, PR: Parsiyel Yanıt. REFR: Refrakter.

### ROCK1 ve ROCK2 Gen Polimorfizmleri

*ROCK1* geni rs111874856, rs112108028, rs35996865, rs1045144 ve rs112130712 polimorfizmleri analizinde hasta ve kontrol gruplarında herhangi bir polimorfizm saptanmamıştır, dolayısıyla sonuçlar sunulmamıştır.

MCL ve kontrol grubunda *ROCK2* geni rs2290156, rs965665, rs10178332, rs2230774 (Thr431Asn), rs2230774 (Thr431Ser), rs6755196, rs726843 polimorfizmleri genotip dağılımı ve allel sıklıkları Tablo 10'da gösterilmiştir. MCL hastaları ve kontrol grubunda görülen polimorfizmler arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

**Tablo 10.** Hasta ve kontrol grubunda *ROCK2* gen polimorfizmlerine ait genotip ve allel dağılımı.

Gen SNP	Genotip/ Allel	Kontrol	n*	Mantle Cell Lenfoma	n*	P
<i>ROCK2</i>	GG/GC/CC	29/25/2	56	28/22/4	54	0.6572
rs2290156	G/C	83/29		78/30		0.8703
<i>ROCK2</i>	CC/CG/GG	41/5/5	51	36/9/1	46	0.1432
rs965665	C/G	87/15		81/11		0.6746
<i>ROCK2</i>	TT/TG/GG	45/8/3	56	44/9/0	53	0.2243
rs10178332	T/G	98/14		97/9		0.3829
<i>ROCK2</i>	TT/TG/GG	15/30/10	55	14/28/12	54	0.8710
rs2230774 (Thr431Asn)	T/G	60/50		56/52		0.7927
<i>ROCK2</i>	GG/GC/CC	40/16/0	56	39/15/0	54	1.0000
rs2230774 (Thr431Ser)	G/C	96/16		93/15		1.0000
<i>ROCK2</i>	CC/CT/TT	34/17/3	54	36/16/0	52	0.2175
rs6755196	C/T	86/23		88/16		0.2940
<i>ROCK2</i>	TT/TC/CC	16/28/12	56	13/26/15	54	0.7112
rs726843	T/C	60/52		52/56		0.5032

\*BioMark HD dinamik array sisteminde kayıp verilerden dolayı n sayısı farklılık göstermiş, toplam hasta sayısı olan 60'a çıkamamıştır.

## 5. TARTIŞMA

MCL'nin altta yatan biyoloji ve patogeneziye yönelik giderek artan bilgiler, moleküler hedefli tedavi yaklaşımlarının temelini oluşturmaktadır (38). Ancak, MCL'nin moleküler patogenezinin anlaşılmasındaki ilerlemelere rağmen, hala tedavide yetersiz kalınmaktadır (68). Bu nedenle hedefe yönelik tedavi yöntemleri oluşturabilmek için MCL'nin patogenezi araştırılmaya devam edilmekte ve yapılan çalışmalar, hücre siklus fazının bozulması sonucu oluşan MCL'nin tedavisinde hücre içi yolakların önemli hedefler oluşturabileceğini göstermektedir (1). Örneğin; MCL patogeneziinde sorumlu tutulan moleküllerden biri NFκB ve bu molekülün aktivasyon ya da inaktivasyonunda rol oynayan ubiquitin-proteazom yoludur. Ubiquitin proteazom yolu, intrasellüler protein dengesi için gereklidir ve malign hastalıkların tedavisi için geçerli bir hedefi temsil eder. Ubiquitin proteazom yolunda etkili olan bortezomib adlı proteazom inhibitörünün relaps ya da refrakter MCL'de kullanılması ile %45 objektif yanıt elde edilmiştir. MCL'de diğer bir hedef CD20 yüzey antijenidir ve bu antijene karşı geliştirilmiş antiCD20 antikoları tedavide kullanılmaktadır. Şimdiye kadar, en çok bortezomib, lenalidomid ve temsirolimusla ilgili veriler sunulmuştur (38).

Son yapılan çalışmalarda SOX-11 adlı bir nöral transkripsiyon faktörünün hem siklin D1 negatif hem de siklin D1 pozitif MCL'da yeni bir marker olduğu ve SOX-11 ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (33, 69,70). SOX-11 de tedavi hedefleri arasında yerini alacak önemli adaylardan biri olabilir.

Kanser patogenezi ve metastazında önemli rolleri olan bir başka hücre siklus düzenleyicileri de Rho GTPaz'lar ve Rho-kinaz (ROCK1 ve ROCK2) enzimidir (42,71). Günümüzden yaklaşık 20 yıl önce keşfedilen Rho kinazlarla ilgili, özellikle kanserler başta olmak üzere birçok hastalığın moleküler mekanizmasının aydınlatılabilmesi için oldukça fazla çalışma yapılmıştır ve yapılan çalışmalarda Rho GTPaz'ların tümör oluşumu, invazyon ve metastazla ilgili olduğu gösterilmiştir. İki ROCK izoformunun artmış protein ekspresyonları kanserin farklı tipleriyle ilişkili bulunmuştur (71).

Hücre siklus fazı düzenleyicilerinden Rho GTPaz'lar, hücre siklus bozukluğu şeklinde tanımlanan kanser oluşumuna nasıl katkıda bulunur? Her iki ROCK genindeki somatik mutasyonların bazıları onların aktif formunu kodlar. Aktif formu kodlayan mutasyonlar, kanser hücre kültürlerindeki insan kanser genomlarında ve primer insan tümörlerinde tespit edilmiştir. ROCK1 geninde üç mutasyon tespit edilmiştir. Bunlardan ikisi insan meme kanserlerinde, biri de küçük hürel dışı akciğer kanser hücre serilerinde analiz edilmiştir. Bu mutasyonların üçü de otoinhibisyon yokluğu sonucu artmış kinaz aktivasyonuna sebep olurlar. Primer mide kanseri ve malign melanom hücre kültürlerinde ROCK2'de de mutasyonlar analiz edilmiştir. Bu mutasyonlar benzer konumlarda ROCK1'de tespit edilen mutasyonlarla eşdeğerdir (72). ROCK'ların artmış protein düzeyleri çeşitli insan kanserlerinde tanımlanmıştır, fakat protein ekspresyon artışının ROCK'ın total aktivitesindeki bir artışla korele olmayabileceği unutulmamalıdır (73).

Çalışmamızda Ki-67, p63 ve p53 ile elde ettiğimiz sonuçları ve hasta karakteristiklerini literatür bilgileriyle karşılaştırdık. Bu bulgular MCL hastalarının literatürde belirtilen özellikleriyle paralellik göstermektedir (74-76).

European MCL Network çalışma grubu tarafından yapılan çok merkezli bir çalışmada 351 MCL hastası (üç prospektif ve 1972-1994 yılları arasında beş retrospektif çalışma), histopatolojik, hücre proliferasyon indeksleri ve klinik sonlanım açısından incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları geniş hasta sayısı nedeniyle güvenilir kabul edilmiş ve Ki-67 proliferasyon indeksinin MCL'nin prognozunu belirlemedeki önemi vurgulanmıştır. Ki-67 proliferasyon indeksi ile yaşam süresi arasındaki ilişki; Ki-67 oranı %10'dan küçük olan grupta ortalama yaşam 42 ay, %11-40 arasında olan grupta 30 ay, %40'tan büyük grupta ise 15 ay olarak bulunmuştur (74). Determann ve arkadaşlarının (77) yaptığı çalışmada ise Ki-67'nin %10 üzerindeki değerlerinin kötü prognozla ilgili olduğu gösterilmiştir. NCCN 2013 Non-Hodgkin lenfoma rehberinde ise %30 üzerindeki Ki-67 değerinin kötü pronozla ilişkili olduğu belirtilmiştir (19).

Bizim çalışmamızda ise Ki-67 proliferasyon indeksini  $\leq$  %30, 31-60 ve  $\geq$ 61 olarak üç gruba ayırdık ve ortalama sağkalımla ilişkisini değerlendirdik.  $\leq$  %30 altında olan grupta ortalama sağkalım yaklaşık 20 ay, 31-60 olan grupta 30 ay ve  $\geq$ 61 olan grupta ise 24 ay olarak hesapladık (Tablo 7). İkinci ve üçüncü grup arasında ortalama yaşam süreleri arasında 6 ay fark vardı, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte literatür bilgileriyle

uyumluydu. Ancak, ilk grubun sonuçları literatürle uyumlu değildi; bu sonucu birinci grubun yaş ortalamasının ikinci gruptan daha fazla olması ve sağlıklı bir sonuç elde edebilmek için yeterli hasta sayısının olmamasıyla açıklayabiliriz. Tedaviye yanıt ve Ki-67 oranları karşılaştırıldığında refrakter grubun Ki-67 oranlarının daha yüksek olduğunu gördük, bu sonuç Ki-67 proliferasyon indeksinin kötü prognozla ilişkisini bir kez daha vurgulamaktadır.

Greiner ve arkadaşları (78) 32 MCL vakasında yaptıkları bir çalışmada p53'ün varyant MCL formlarında mutant ve kötü prognozun bir prediktörü olduğunu rapor etmişlerdir.

Başka bir çalışmada p53 overekspresyonu görülen MCL vakalarının ortalama sağkalım süreleri 12 ay iken p53 overekspresyonu görülmeyenlerde ise 63 ay olduğu bildirilmiştir (79).

Bizim çalışmamızda p53 ile, 35 (%58) hasta örneğinde hiç boyanma görülmedi, 13 (%21,6) vakada hafif boyanma, 7 (%11,6) vakada orta ve 5 (%8,3) vakada kuvvetli boyanma görüldü. Prognostik faktörlerle ilişkisini incelediğimizde, p53'le MIPI skoru, LDH ve Ki-67 arasında anlamlı pozitif korelasyon tespit ettik.

p63'ün malign lenfomalarındaki rolü ile ilgili Park ve Oh'nın (80) yaptıkları çalışmada toplam 126 malign lenfoma vakası p63 ve p53 için immunhistokimyasal boyama yapılarak incelenmiştir. Tüm lenfoma vakalarının 38'inde (%30,2) p63 ekspresyonu görülmüştür. Bunlardan, 61 diffüz büyük B-hücreli lenfoma (DBBL) vakalarının 32'sinde (%52,5), 8 prekürsör T-lenfoblastik lenfoma (T-LBL) vakalarının 1'inde (%12,5), 14 folliküler lenfoma (FL) vakalarının 4'ünde (%28,6), 6 T/NK hücreli lenfoma vakalarının 1'inde (%16,7) p63 ekspresyonu görülmüştür. p63 pozitif olan 32 DBBHL'nin 15'inde ve 1 T-LBL'nin 1'inde kuvvetli p63 ekspresyonu görülmüştür. 3 MCL, 22 periferik T-hücreli lenfoma (PTCL), 2 marjinal zon B-hücreli lenfoma (MZBCL), 1 plazmasitoma ve 5 Hodkin's lenfoma (HL) vakalarının hiçbirinde p63 ekspresyonu görülmemiştir. p63 pozitif olan 38 vakanın 4'ü kuvvetli olmak üzere 18'inde p53'le birlikte p63 koekspresyonu görülmüş ve bu koekspresyon gösteren lenfomaların tümünün DBBHL vakaları olduğu tespit edilmiştir. P63 aşırı ekspresyonu (%30'un üzerinde) görülen DBBHL'da kötü sağkalımla ilgili anlamlı ilişki gösterilmiştir. Bununla birlikte çok değişkenli analizlerde p63 ekspresyonu ile IPI skoru arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Aynı çalışmada kontrol grubu olarak 10 reaktif hiperplasi gösteren tonsil dokusunda p53 ve p63 ekspresyonu görülmemiştir (80).

Biz de çalışmamızda bu çalışma ile benzer sonuçlar elde ettik. 60 reaktif lenfoid hiperplazilerin hiçbirinde p63 ekspresyonu görülmedi. 60 MCL hastasının sadece 1'inde p63 ile boyanma görüldü. Bu hastanın toplam sağkalım süresi 10 gün, Ki-67 proliferasyon indeksi %90'dı ve p53, ROCK1, ROCK2 ile kuvvetli immunohistokiyasal boyanma vardı. 1 hastada görülen p63 ekspresyonu anlamlı kabul edilemez, ancak yine de "p63 ekspresyonu çok agresif lenfoma ile ilişkili midir?" sorusuna daha fazla vaka sayısıyla yapılacak bir çalışma yanıt verebilir.

Mantle cell lenfomada Rho kinazların prognoza ilişkisini araştıran bir literatür bilgisi olmadığı için ROCK1 ve ROCK2 ile MCL arasında tespit ettiğimiz sonuçları literatürle karşılaştıramadık. Ancak diğer kanser türleriyle Rho kinazların ilişkisini araştıran çalışmalarla bizim bulgularımızı karşılaştırdığımızda benzer sonuçlar elde ettiğimizi gördük.

Lane ve arkadaşları (73) yaptıkları çalışmada her iki ROCK'ın protein düzeylerini insan meme kanserlerinde yüksek bulmuşlar ve yüksek ROCK1 ekspresyonunun artmış tümör derecesi yanısıra kötü sağkalımla ilişkili olduğu rapor etmişlerdir. Liu ve arkadaşlarının (81) çalışmasında ise, osteosarkomada ROCK1 proteininin ekspresyonunun yüksek düzeyleri kötü genel sağkalımla ilişkili bulunmuştur.

Başka bir çalışmada ROCK2 proteininin artmış ekspresyonunun, hepatosellüler kanserlerde daha agresif davranışla ilişkili olduğu görülmüştür (82). Artmış ROCK2 protein ekspresyonu kolon ve mesane kanserlerinde de rapor edilmiş ve mesane kanserli hastalarda kısa hastaliksız sağkalımla ilişkili bulunmuştur (83,84).

Bizim çalışmamızda da, MCL'lı hasta örnekleriyle kontrol grubu karşılaştırıldığında hem ROCK1 hem de ROCK2 protein ekspresyonlarının artmış olduğu ve ROCK2'deki artışın daha fazla olduğu görüldü. Ancak MCL'nın kötü prognostik faktörlerinden, LDH, Ki-67, p53 ile ROCK1 ve ROCK2 arasında bir korelasyon tespit edilmezken, yaş ile ROCK1 arasında anlamlı pozitif korelasyon saptandı (Tablo 4-5).

Gen mutasyonları kanser oluşumunun merkezinde yer alır. Rho kinazlardaki mutasyonlar ve kanser arasındaki ilişki yapılmış çalışmalarla gösterilmiştir (72). Yaşla birlikte bir çok hastalıkta olduğu gibi kanser riski de artmıştır. Bunun sebebi yaşlanmayla birlikte artan gen mutasyonlarıdır. Somatik hücreler sürekli DNA hasarına neden olabilecek çeşitli kaynaklara maruz kalmakta ( UV radyasyon, reaktif oksijen radikalleri, kimyasallar vb) ve bu maruziyet yaşla birlikte artmaktadır. Bu durum gen mutasyonları ve kanser oluşum riskini artırmaktadır (85). MCL, ileri yaşta, erkeklerde daha fazla görülmektedir ve erkekler yaşamları süresince çevresel mutajenlere daha fazla maruz kalmaktadırlar. Çalışmamızda elde ettiğimiz yaşla pozitif korelasyon gösteren ROCK1 ekspresyon artışlarını bu mekanizmayla açıklayabiliriz. Ancak ROCK1 ve ROCK2 protein artışının sebebi artmış gen ekspresyonu mudur ve eksprese olan rho kinazlar mutant mıdır? Bu sorular yeterli vaka sayısı ile yapılacak iyi planlanmış çalışmalarla yanıt bulabilir.

Rho kinaz gen polimorfizmlerinin kanserle ilişkisini araştıran çalışmalarda ise ROCK1 ve/veya ROCK2 tek nükleotid polimorfizmlerinin kanser gelişmesi ve metastazla ilgili olduğu gösterilmiştir (57, 86, 87).

Biz çalışmamızda ROCK1 ve ROCK2 genlerinde anlamlı sayıda bir polimorfizm tespit edemedik. Hasta sayısının az olması ve dokuların eski olması nedeniyle polimorfizm saptanmamış olabilir.

Burada özetlenen çalışmalar ve benzer birçok çalışmada gösterilen Rho GTPaz'larla insan kanserlerinin ilişkisi, hedefe yönelik kanser tedavisinde Rho/Rho-kinaz yolu inhibitörlerinin araştırılmasını ve kullanılmasını gündeme getirmiştir.

Günümüzde ROCK inhibitörleri insan kanserlerinin tedavisi için klinik çalışmalarda ya da kullanımda değildir, fakat birkaç ROCK inhibitörü ile yapılan çalışmalar, hem insan kanser hücre kültürlerinde hem de hayvan kanser modellerinde kanser gelişmesi ve progresyonunda ROCK sinyalizasyonunun önemli katkısını desteklemiştir. Fasudil, Wf-536, Y-27632 ve RKI-1447 gibi ROCK inhibitörleri ile hepatosellüler ve akciğer karsinomaları, myeloma ve farelerde meme kanserlerinde tümör progresyonunun baskılandığı gösterilmiştir (72).

Yang ve arkadaşlarının (88) yaptıkları çalışmada bir Rho kinaz inhibitörü olan fasudilin küçük hücreli dışı akciğer kanser hücrelerinde hem büyümeyi hem de metastazı azalttığını göstermişlerdir. Nakajima ve arkadaşlarının (89) yaptıkları *in vitro* çalışmada ise

hücre kültürlerinde kanser hücrelerinin motilitesi ve invazyonunun Wf-536 ve Y-27632 tarafından inhibe edildiği ve Wf-536'nın Y-27632'den 2-3 kat daha potent olduğu gösterilmiştir. Relja ve arkadaşlarının (90) yaptıkları *in vitro* bir çalışmada simvastatinin Rho kinaz yolu inhibisyonu ile hepatoselluler kanser hücrelerinde antitümör etkilerini göstermişlerdir. Ohta ve arkadaşlarının (91) yaptıkları *in vitro* çalışmada ise Rho/ROCK yolunun fasudil ile inhibisyonunun sisplatin ile muamele edilmiş over kanser hücrelerinin canlılığını daha efektif azalttığını göstermişlerdir. Rho/ROCK yolunun inhibisyonunun sisplatinin neden olduğu tümör büyümesinin engellenmesi ve tümör hücrelerinde apoptozunun indüklenmesini kuvvetlendirdiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada ROCK1 ve ROCK2'nin inhibisyonunun aynı derecede antitümör etki göstermediğini, over kanser hücrelerinde ROCK1 inhibisyonunun daha efektif olduğunu görmüşler ve farklı kanser türlerinde ROCK1 ve ROCK2 inhibisyonunun farklı etkiler gösterebileceği sonucunu çıkarmışlardır (91).

Sonuç olarak, MCL hastalarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ROCK2'deki artışın daha fazla olmakla birlikte, hem ROCK1 hem de ROCK2 düzeylerinin artmış olduğunu, ancak bu artmış ekspresyonların ortalama sağ kalım ve tedaviye yanıtla anlamlı bir ilişki göstermediğini, ileri yaşın ve Ki-67 proliferasyon indeksinin önemli prognostik faktörler olduğunu ve MCL vakalarında ROCK1 düzeylerinin yaşla birlikte artmış olduğunu tespit ettik.

Yaptığımız çalışmanın, bu konuyla ilgili yapılacak diğer çalışmalarla desteklenerek ya da farklı sonuçlar bulunarak mantle cell lenfoma hastalarında hedefe yönelik tedavi arayışlarına bir katkı sağlayacağını umut ediyoruz.



## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda şu sonuçlara varılmıştır:

1. Kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda MCL hastalarında ROCK1 ve ROCK2 protein ekspresyonu artmıştır.
2. MCL hastalarında ROCK2 protein ekspresyonu ROCK1 ekspresyonundan daha fazladır.
3. Yaş ile ROCK1 ekspresyonu arasında anlamlı pozitif korelasyon vardır.
4. Artmış ROCK1 ve ROCK2 ekspresyonları, tedaviye yanıt ve ortalama sağkalımla ilişkili görülmemiştir.
5. İleri yaş ve Ki-67 önemli prognostik faktörlerdir.
6. Kemoterapi kür sayısı ile ROCK1 ve ROCK2 ekspresyonları arasında anlamlı negatif korelasyon görülmüştür.
7. Kontrol grubunda hiç p63 ekspresyonu görülmezken, hasta grubunda yalnız 1 hastada p63 ekspresyonu görülmüş ve en kısa sağkalım süresi (10 gün) bu hastaya aittir. Aynı hastada Ki-67 proliferasyon indeksi %90 ve kuvvetli p53, ROCK1, ROCK2 protein ekspresyonları görülmüştür.
8. ROCK1 geni polimorfizmleri analizinde hasta ve kontrol grubunda herhangi bir polimorfizm saptanmamıştır.
9. ROCK2 geni polimorfizmleri analizinde MCL hastaları ve kontrol grubunda görülen polimorfizmler arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.
10. Daha anlamlı sonuçlar elde edebilmek için daha fazla hasta sayısı ve daha uzun takip süreleri ile çalışma yapılması,
11. p63 ekspresyonu ve agresif lenfoma ilişkisi, MCL'da ROCK1 ve ROCK2 gen ekspresyon ve mutasyonlarının araştırılması önerilebilir.

## 7. KAYNAKLAR

- 1- Barista I, Romaguera JE, Cabanillas F. Mantle-cell lymphoma. *Lancet Oncol.* 2001;2(3):141-8.
- 2- Türk Hematoloji Derneği, Ulusal Tanı ve Tedavi Kılavuzu 2012, Lenfoma Tanı ve Tedavi Kılavuzu 2012, III. Bölüm, Mantle Hücreli Hodgkin Dışı Lenfoma Tanı ve Tedavi Kılavuzu, s. 37-48.
- 3- Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC, Croce CM. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science.* 1984; 224(4656):1403-6.
- 4- Yoshinaga K, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Utsunomiya T, Mori M. Platelet-derived endothelial cell growth factor mediates Rho-associated coiled-coil domain kinase messenger RNA expression and promotes cell motility. *Ann Surg Oncol* 2003;10(5):582-7.
- 5- Fritz G, Brchetti C, Bahlmann F, Schmidt M, Kaina B. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer.* 2002;87(6):635-44.
- 6- Nakajima M, Hayashi K, Katayama K, Amano Y, Egi Y, Uehata M, Goto N, Kondo T. Wf-536 prevents tumor metastasis by inhibiting both tumor motility and angiogenic actions. *Eur J Pharmacol.* 2003;459(2-3):113-20.
- 7- Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Nat Can Inst.* 1996; 88(20): 1442-55.
- 8- Gabriel JA. *The Biology of Cancer*, (Second Ed.), John Wiley and Sons Ltd, West Sussex, England. 2007:37-40.
- 9- Bunz F. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science.* 1998; 282:1497-501.
- 10- Schulz WA. *Molecular biology human cancers an advanced student's textbook*, Springer, Dordrecht, Netherlands 2007: 101-109.
- 11- Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with

transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*. 1998;2(3):305-16.

12- Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology*. 2002;40(1):2-11.

13- Klapper W, Hoster E, Determann O, Oschlies I, van der Laak J, Berger F, Bernd HW, Cabeçadas J, Campo E, Cogliatti S, Hansmann ML, Kluin PM, Kodet R, Krivolapov YA, Loddenkemper C, Stein H, Möller P, Barth TE, Müller-Hermelink K, Rosenwald A, Ott G, Pileri S, Ralfkiaer E, Rymkiewicz G, van Krieken JH, Wacker HH, Unterhalt M, Hiddemann W, Dreyling M; European MCL Network. Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma-consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. *J Hematop*. 2009;2(2):103-11.

14- Baastrup Nordsborg R, Meliker JR, Kjær Ersbøll A, Jacquez GM, Raaschou-Nielsen O. Space-time clustering of non-hodgkin lymphoma using residential histories in a Danish case-control study. *PLoS One*. 2013;8(4):e60800.

15- Ekstrom-Smedby K. Epidemiology and etiology of non-Hodgkin lymphoma--a review. *Acta Oncol*. 2006; 45:258-71.

16- Decaudin D, Salanoubat C, Carde P. Is mantle cell lymphoma a sex-related disease? *Leuk Lymphoma*. 2000; 37:181-4.

17- Salar A, Juanpere N, Bellosillo B, Domingo-Domenech E, Espinet B, Seoane A, Romagosa V, Gonzalez-Barca E, Panades A, Pedro C, Nieto M, Abella E, Solé F, Ariza A, Fernández-Sevilla A, Besses C, Serrano S. Gastrointestinal involvement in mantle cell lymphoma: a prospective clinic, endoscopic, and pathologic study. *Am J Surg Pathol*. 2006;30(10):1274-80.

18- Romaguera JE, Medeiros LJ, Hagemester FB, Fayad LE, Rodriguez MA, Pro B, Younes A, McLaughlin P, Goy A, Sarris AH, Dang NH, Samaniego F, Brown HM, Gagneja HK, Cabanillas F. Frequency of gastrointestinal involvement and its clinical significance in mantle cell lymphoma. *Cancer* 2003;97(3):586-91. Erratum in: *Cancer*. 2003;97(12):3131.

19- The National Comprehensive Cancer Network<sup>®</sup> (NCCN<sup>®</sup>), NHL Guideline – 2013.

20- Oinonen R, Franssila K, Elonen E. Central nervous system involvement in patients with mantle cell lymphoma. *Ann Hematol*. 1999; 78:145-9.

21- Montserrat E, Bosch F, López-Guillermo A, Graus F, Terol MJ, Campo E, Rozman C. CNS involvement in mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 1996;14(3):941-4.

22- Bosch F, Jares P, Campo E, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Villamor N, Tassies D, Jaffe ES, Montserrat E, Rozman C, et al. PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in

chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood*. 1994;84(8):2726-32.

23- de Boer CJ, Loyson S, Kluin PM, Kluin-Nelemans HC, Schuurin E, van Krieken JH. Multiple breakpoints within the BCL-1 locus in B-cell lymphoma: rearrangements of the cyclin D1 gene. *Cancer Res*. 1993;53(18):4148-52.

24- Williams ME, Swerdlow SH, Meeker TC. Chromosome t(11;14)(q13;q32) breakpoints in centrocytic lymphoma are highly localized at the bcl-1 major translocation cluster. *Leukemia*. 1993;7(9):1437-40.

25- Medeiros LJ, Van Krieken JH, Jaffe ES, Raffeld M. Association of bcl-1 rearrangements with lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation. *Blood*. 1990;76(10):2086-90.

26- Luthra R, Hai S, Pugh WC. Polymerase chain reaction detection of the t(11;14) translocation involving the bcl-1 major translocation cluster in mantle cell lymphoma. *Diagn Mol Pathol*. 1995;4(1):4-7.

27- Ott G, Kalla J, Ott MM, Schryen B, Katzenberger T, Müller JG, Müller-Hermelink HK. Blastoid variants of mantle cell lymphoma: frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. *Blood*. 1997;89(4):1421-9.

28- Li JY, Gaillard F, Moreau A, Harousseau JL, Laboisie C, Milpied N, Bataille R, Avet-Loiseau H. Detection of translocation t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol*. 1999;154(5):1449-52.

29- Katz RL, Caraway NP, Gu J, Jiang F, Pasco-Miller LA, Glassman AB, Luthra R, Hayes KJ, Romaguera JE, Cabanillas FF, Medeiros LJ. Detection of chromosome 11q13 breakpoints by interphase fluorescence in situ hybridization. A useful ancillary method for the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2000;114(2):248-57.

30- Williams ME, Swerdlow SH. Cyclin D1 overexpression in non-Hodgkin's lymphoma with chromosome 11 bcl-1 rearrangement. *Ann Oncol*. 1994;5 Suppl 1:71-3.

31. de Boer CJ, Schuurin E, Dreef E, Peters G, Bartek J, Kluin PM, van Krieken JH. Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Blood*. 1995;86(7):2715-23.

32. Xu W, Li JY. SOX11 expression in mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2010;51(11):1962-7.

33- Ferrando AA. SOX11 is a mantle cell lymphoma oncogene. *Blood*. 2013; 121:2169-70.

34- Fernández V, Salamero O, Espinet B, Solé F, Royo C, Navarro A, Camacho F, Beà S, Hartmann E, Amador V, Hernández L, Agostinelli C, Sargent RL, Rozman M, Aymerich

M, Colomer D, Villamor N, Swerdlow SH, Pileri SA, Bosch F, Piris MA, Montserrat E, Ott G, Rosenwald A, López-Guillermo A, Jares P, Serrano S, Campo E. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res.* 2010;70(4):1408-18.

35- Hoster E, Dreyling M, Klapper W, Gisselbrecht C, van Hoof A, Kluin-Nelemans HC, Pfreundschuh M, Reiser M, Metzner B, Einsele H, Peter N, Jung W, Wörmann B, Ludwig WD, Dührsen U, Eimermacher H, Wandt H, Hasford J, Hiddemann W, Unterhalt M; German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG); European Mantle Cell Lymphoma Network. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood.* 2008;111(2):558-65.

36- Vose JM. Mantle cell lymphoma: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management. *Am J Hematol.* 2012; 87:605-9.

37- Martin P, Chadburn A, Christos P, Weil K, Furman RR, Ruan J, Elstrom R, Niesvizky R, Ely S, Diliberto M, Melnick A, Knowles DM, Chen-Kiang S, Coleman M, Leonard JP. Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2009;27(8):1209-13.

38- Noel MS, Friedberg JW, Barr PM. Novel agents in mantle cell lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2012;25(2):191-200.

39- Pott C, Hoster E, Delfau-Larue MH, Beldjord K, Böttcher S, Asnafi V, Plonquet A, Siebert R, Callet-Bauchu E, Andersen N, van Dongen JJ, Klapper W, Berger F, Ribrag V, van Hoof AL, Trneny M, Walewski J, Dreger P, Unterhalt M, Hiddemann W, Kneba M, Kluin-Nelemans HC, Hermine O, Macintyre E, Dreyling M. Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study. *Blood.* 2010;115(16):3215-23.

40- Kluin-Nelemans HC, Hoster E, Hermine O, Walewski J, Trneny M, Geisler CH, Stilgenbauer S, Thieblemont C, Vehling-Kaiser U, Doorduijn JK, Coiffier B, Forstpointner R, Tilly H, Kanz L, Feugier P, Szymczyk M, Hallek M, Kremers S, Lepeu G, Sanhes L, Zijlstra JM, Bouabdallah R, Lugtenburg PJ, Macro M, Pfreundschuh M, Procházka V, Di Raimondo F, Ribrag V, Uppenkamp M, André M, Klapper W, Hiddemann W, Unterhalt M, Dreyling MH. Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2012;367(6):520-31.

41- Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22:32-9.

42- Fritz G, Kaina B. Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs. *Curr Cancer Drug Targets.* 2006; 6(1):1-14.

- 43- Mali RS, Kapur R. Targeting Rho Associated Kinases in Leukemia and Myeloproliferative Neoplasms. *Oncotarget*. 2012; 3: 909-10.
- 44- Lai A, Frishman WH. Rho-kinase inhibition in the therapy of cardiovascular disease. *Cardiol Rev*. 2005;13:285-92.
- 45- Katoh K, Kano Y, Amano M, Onishi H, Kaibuchi K, Fujiwara K. Rho-kinase-mediated contraction of isolated stress fibers. *J Cell Biol*. 2001;153:569-84.
- 46- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*. 2001;81:153-208.
- 47- Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 2002;420:629-35.
- 48- Sin WC, Chen XQ, Leung T, Lim L. RhoA-binding kinase alpha translocation is facilitated by the collapse of the vimentin intermediate filament network. *Mol Cell Biol*. 1998;18:6325-39.
- 49- Loirand G, Guérin P, Pacaud P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res*. 2006;98:322-34.
- 50- Engelsen IB, Stefansson IM, Beroukhim R, Sellers WR, Meyerson M, Akslen LA, Salvesen HB. HER-2/neu expression is associated with high tumor cell proliferation and aggressive phenotype in a population based patient series of endometrial carcinomas. *Int J Oncol*. 2008;32(2):307-16.
- 51- Massagué J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*. 2004; 432: 298-306.
- 52- Caldon CE, Daly RJ, Sutherland RL, Musgrove EA. Cell cycle control in breast cancer cells. *J Cell Biochem*. 2006; 97(2):261-274.
- 53- Malumbres M. Cyclins and related kinases in cancer cells. *J BUON* 2007; Suppl 1: S45-52.
- 54- Meeran SM, Katiyar SK. Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. *Front Biosci*. 2008; 13:2191-202.
- 55- Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999; 13:1501-12.
- 56- Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999; 39:295-312.
- 57- Bélanger H, Beaulieu P, Moreau C, Labuda D, Hudson TJ, Sinnett D. Functional promoter SNPs in cell cycle checkpoint genes. *Hum Mol Genet*. 2005; 14:2641-8.
- 58- D'Andrilli G, Kumar C, Scambia G, Giordano A. Cell cycle genes in ovarian cancer. *Clin Can Res*. 2004; 10:8132-41.

- 59- Zhao J, Pestell R, Guan JL. Transcriptional activation of cyclin D1 promoter by FAK contributes to cell cycle progression. *Mol Biol Cell*. 2001; 12:4066-77.
- 60- Jiang W, Kahn SM, Tomita N, Zhang YJ, Lu SH, Weinstein IB. Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer Res*. 1992; 52(10):2980-3.
- 61- Proctor AJ, Coombs LM, Cairns JP, Knowles MA. Amplification at chromosome 11q13 in transitional cell tumours of the bladder. *Oncogene*. 1991; 6(5):789-95.
- 62- Varley JM, Evans DGR, Birch JM. Li-Fraumeni syndrome-a molecular and clinical review. *Br J Cancer*. 1997; 76(1):1-14.
- 63- Westfall MD, Pietenpol JA. p63: molecular complexity in development and cancer. *Carcinogenesis*. 2004; 25 (6):857-64.
- 64- Levrero M, Laurenzi VD, Costanzo A, Sabatini S, Gong J, Wang JYJ, Melino G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci*. 2000; 113:1661-70.
- 65- Mills AA, Zheng BH, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*. 1999; 398(4):708-13.
- 66- Moll UM, Slade N. p63 and p73: Roles in development and tumor formation, *Mol Cancer Res*. 2004;2:371-386.
- 67- Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*. 1999;398(6729):714-8.
- 68- Ghobrial IM, McCormick DJ, Kaufmann SH, Leontovich AA, Loegering DA, Dai NT, Krajnik KL, Stenson MJ, Melhem MF, Novak AJ, Ansell SM, Witzig TE. Proteomic analysis of mantle-cell lymphoma by protein microarray. *Blood*. 2005;105(9):3722-30.
- 69- Seto M. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma. *Blood*. 2013;121(8):1249-50.
- 70- Mozos A, Royo C, Hartmann E, De Jong D, Baró C, Valera A, Fu K, Weisenburger DD, Delabie J, Chuang SS, Jaffe ES, Ruiz-Marcellan C, Dave S, Rimsza L, Braziel R, Gascoyne RD, Solé F, López-Guillermo A, Colomer D, Staudt LM, Rosenwald A, Ott G, Jares P, Campo E. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica*. 2009;94(11):1555-62.
- 71- Hahmann C, Schroeter T. Rho-kinase inhibitors as therapeutics: from pan inhibition to isoform selectivity. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67:171-7.
- 72- Morgan-Fisher M, Wewer UM, Yoneda A. Regulation of ROCK activity in cancer. *J Histochem Cytochem*. 2013;61(3):185-98.

- 73- Lane J, Martin TA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG, The expression and prognostic value of ROCK I and ROCK II and their role in human breast cancer. *Int J Oncol.* 2008; 33:585-93.
- 74- Tiemann M, Schrader C, Klapper W, Dreyling MH, Campo E, Norton A, Berger F, Kluin P, Ott G, Pileri S, Pedrinis E, Feller AC, Merz H, Janssen D, Hansmann ML, Krieken H, Möller P, Stein H, Unterhalt M, Hiddemann W, Parwaresch R; European MCL Network. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol.* 2005;131(1):29-38.
- 75- Ying T-Z, Zheng W, Wang X-P, The clinical features, therapeutic responses, and prognosis of the patients with mantle cell lymphoma. *Chin J Cancer.* 2012;31(7):348-53.
- 76- Zhou Y, Wang H, Fang W, Romaguer JE, Zhang Y, Delasalle KB, Kwak L, Yi Q, Du XL, Wang M. Incidence trends of mantle cell lymphoma in the United States between 1992 and 2004. *Cancer.* 2008;113(4):791-8.
- 77- Determann O, Hoster, Ott G. Ki-67 predicts outcome in advanced-stage mantle cell lymphoma patients treated with anti-CD20 immunochemotherapy: results from randomized trials of the European MCLNetwork and the German Low Grade Lymphoma Study Group. *Blood.* 2008; 111: 2385-2387.
- 78- Greiner BT, Moynihan MJ, Chan WC, p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood.* 1996; 87: 4302-4310.
- 79- Louie DC, Offit K, Jaslow R, Parsa NZ, Murty VV, Schluger A, Chaganti RS. p53 overexpression as a marker of poor prognosis in mantle cell lymphomas with t(11;14)(q13;q32). *Blood.* 1995;86(8):2892-9.
- 80- Park CK, Oh YH. Expression of p63 in reactive hyperplasias and malignant lymphomas. *J Korean Med Sci.* 2005;20(5):752-8.
- 81- Liu X, Choy E, Hornicek FJ, Yang S, Yang C, Harmon D, Mankin H, Duan Z. ROCK1 as a potential therapeutic target in osteosarcoma. *J Orthop Res.* 2011;29(8):1259-66.
- 82- Wong CC, Wong CM, Tung EK, Man K, Ng IO. Rho-kinase 2 is frequently overexpressed in hepatocellular carcinoma and involved in tumor invasion. *Hepatology.* 2009;49(5):1583-94.
- 83- Kamai T, Kawakami S, Koga F, Arai G, Takagi K, Arai K, Tsujii T, Yoshida KI. RhoA is associated with invasion and lymph node metastasis in upper urinary tract cancer. *BJU Int.* 2003;91(3):234-8.



- 84- Vishnubhotla R, Sun S, Huq J, Bulic M, Ramesh A, Guzman G, Cho M, Glover SC. ROCK-II mediates colon cancer invasion via regulation of MMP-2 and MMP-13 at the site of invadopodia as revealed by multiphoton imaging. *Lab Invest.* 2007;87(11):1149-58.
- 85- Vijg J, Suh Y. Genome instability and aging. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:645-68.
- 86- Sari I, Berberoglu B, Ozkara E, Oztuzcu S, Camci C, Demiryurek AT. Role of rho-kinase gene polymorphisms and protein expressions in colorectal cancer development. *Pathobiology.* 2013;80(3):138-45.
- 87- Kalender ME, Demiryurek S, Oztuzcu S, Kizilyer A, Demiryurek AT, Sevinc A, Dikilitas M, Yildiz R, Camci C. Association between the Thr431Asn polymorphism of the ROCK2 gene and risk of developing metastases of breast cancer. *Oncol Res.* 2010;18(11-12):583-91.
- 88- Yang X, Di J, Zhang Y, Zhang S, Lu J, Liu J, Shi W. The Rho-kinase inhibitor inhibits proliferation and metastasis of small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother.* 2012;66(3):221-7.
- 89- Nakajima M, Katayama K, Tamechika I, Hayashi K, Amano Y, Uehata M, Goto N, Kondo T. WF-536 inhibits metastatic invasion by enhancing the host cell barrier and inhibiting tumour cell motility. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003;30(7):457-63.
- 90- Relja B, Meder F, Wang M, Blaheta R, Henrich D, Marzi I, Lehnert M. Simvastatin modulates the adhesion and growth of hepatocellular carcinoma cells via decrease of integrin expression and ROCK. *Int J Oncol.* 2011;38(3):879-85.
- 91- Ohta T, Takahashi T, Shibuya T, Amita M, Henmi N, Takahashi K, Kurachi H. Inhibition of the Rho/ROCK pathway enhances the efficacy of cisplatin through the blockage of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in human ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2012;13(1):25-33.

## 8. EKLER

### 8.1. Etik Kurul Kararı

#### GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Mantle Cell Lenfoma Hastalarında Rho Kinaz Gen Polimorfizmleri İle Gen ve Protein Ekspresyonlarının Araştırılması			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	143			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Mehmet YILMAZ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Hematoloji Bilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı-Hematoloji Bilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	<input type="checkbox"/>			
	Yüksek Doz Araştırması	<input type="checkbox"/>			
	Diğer ise belirtiniz:				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	HASTA KARTI/GÜNÜKLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>			

## GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 03.04.2012/143	Tarih: 03.04.2012
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	
	Sağlık Bakanlığına Bildirilecek	Evet <input type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/>

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Doç.Dr. Belgin ALAŞEHİRLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilgili		Katılım *		İmza
Doç.Dr.Belgin ALAŞEHİRLİ	FARMAKOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K x <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H x <input type="checkbox"/>	E x <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Vedat DAVUTOĞLU	KARDİYOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E x <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H x <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç.Dr.Ercan SIVASLI	PEDİATRİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E x <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H x <input type="checkbox"/>	E x <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç.Dr.A.Mesut ONAT	İÇ HASTALIKLARI Romatoloji	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E x <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H x <input type="checkbox"/>	E x <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç.Dr.Yasemin ZER	MİKROBİYOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K x <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H x <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Yrd.Doç.Dr.Nejdet ADANIR	DIŞ HEKİMLİĞİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E x <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H x <input type="checkbox"/>	E x <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Yrd.Doç.Dr.Beyhan CENGİZ	FİZYOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E x <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H x <input type="checkbox"/>	E x <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Yrd.Doç.Dr. Arif TÜRKMEN	Plastik Rek. ve Est. Cerrahi	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E x <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H x <input type="checkbox"/>	E x <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Yrd.Doç.Dr.Seval KUL	BIYOİSTATİSTİK	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K x <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H x <input type="checkbox"/>	E x <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Uzm.Dr. Cahide Elif ORHAN	FARMAKOLOJİ	Gaziantep İl Sağlık Müdürlüğü	E <input type="checkbox"/>	K x <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H x <input type="checkbox"/>	E x <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Eyüp ÇELİK	AVUKAT	Gaziantep Barosu	E x <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H x <input type="checkbox"/>	E x <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Baha Günhan GÜNCÖRDÜ	İNŞ.MÜH (sivil Uye)	GASKİ	E x <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H x <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>

\* :Toplantıda Bulunma

Ziden teslim dedim  
Didar Gençoğlu AĞIK  
26.04.2012  
*[Signature]*