

T.C
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**HODGKİN LENFOMADA COX-2, BCL-2 VE LMP-1
EKSPRESYONLARININ İMMÜNHİSTOKİMYASAL
YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI VE PROGNOZ İLE
İLİŞKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Dr. GÜLSÜN İNAN

PATOLOJİ ANABİLİM DALI UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. SEMA BİRCAN

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 1663-TU-08
proje numarası ile desteklenmiştir.**

2009-İSPARTA

KABUL VE ONAY SAYFASI

Tıp Fakültesi Dekanlığına,

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi

Patoloji Anabilim Dalı Başkanlığı

çerçevesince yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Uzmanlık Tez Savunma Tarihi: 03/07/2009

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sema BİRCAN SDÜ

Üye : Doç. Dr. F. Nilgün KAPUCUOĞLU SDÜ

Üye : Doç. Dr. Nermin KARAHAN SDÜ

Üye : Yrd. Doç. Dr. İ. Metin ÇİRİŞ SDÜ

Üye : Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN SDÜ

ONAY: Bu uzmanlık tezi, Fakülte Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim Kurulu Kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yıldırım SONGÜR

Dekan

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, üzerimde emeği geçen, değerli hocalarım Doç. Dr. F. Nilgün Kapucuoğlu, Doç Dr. Sema Bircan, Doç. Dr. Nermin Karahan ve Yrd. Doç. Dr. İ. Metin Çiriş'e; ayrıca tez çalışmam boyunca bana destek olup, yardımını benden esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Sema Bircan'a; vakaların immünohistokimyasal boyanmasında yardım ve emekleri için teknisyen Vasfi Baran'a ve diğer laboratuvar çalışanlarına; tezimdaki bir vakanın bloklarını vererek çalışmama katkıda bulunan Isparta Devlet Hastanesi patoloji bölümünden uzman doktor Kayhan Başak'a; manevi desteklerini ve dostluklarını esirgemeyen, huzurlu bir çalışma ortamı oluşturan değerli araştırma görevlisi arkadaşlarıma; manevi destekleri, yardımları ve sonsuz sevgilerinden ötürü beni bugünlere getiren üzerimde haklarını ödeyemeyeceğim en büyük emekleri bulunan annem Canan İnan, babam Önal İnan ve kardeşim Onur İnan'a teşekkür ederim.

Ayrıca 1663-TU-08 No'lu Proje ile tezime maddi destek sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv-vi
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	vii
Şekiller Dizini	viii
Resimler Dizini	ix
Çizelgeler Dizini	x-xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. HODGKİN LENFOMA	3
2.1.1. Tanımlama ve Sınıflandırma	3
2.1.2. Evreleme	5
2.2. KLASİK HODGKİN LENFOMA	5
2.2.1. Epidemiyoloji	6
2.2.2. Tutulum bölgeleri ve Klinik özellikler	6
2.2.3. Etyoloji	7
2.2.4. Histopatolojik Özellikler	7
2.2.5. İmmünofenotipik Özellikler	8
2.2.6. Sitokinler ve Kemokinler	9
2.2.7. Genetik	9
2.2.7.1. Antijen reseptör genleri	9
2.2.7.2. İmmünglobulin genlerinin somatik mutasyonları	10
2.2.7.3. İmmünglobulin transkripsiyonunun inaktivasyonu	10
2.2.7.4. Apoptozun blokajı	10
2.2.8. Epstein-Barr Virüs İnfeksiyonu	11
2.2.9. Sitogenetik Özellikler	12
2.2.10. Prognostik Özellikler	12
2.2.11. KLASİK HODGKİN LENFOMANIN HİSTOLOJİK	13
ALT TIPLERİ	
2.2.11.1. Nodüler Sklerozan Klasik Hodgkin Lenfoma	13

2.2.11.1.1. Tanımlama	13
2.2.11.1.2. Epidemiyoloji	13
2.2.11.1.3. Tutulum bölgeleri ve Klinik Özellikler	13
2.2.11.1.4. Histopatolojik ve İmmünofenotipik Özellikler	13
2.2.11.1.5. Prognostik Özellikler	14
2.2.11.2. Miks Hücreli Klasik Hodgkin Lenfoma	14
2.2.11.2.1. Tanımlama	14
2.2.11.2.2. Epidemiyoloji	14
2.2.11.2.3. Tutulum Bölgeleri ve Klinik Özellikler	14
2.2.11.2.4. Histopatolojik ve İmmünofenotipik Özellikler	14
2.2.11.2.5. Prognostik Özellikler	15
2.2.11.3. Lenfosit Zengin Klasik Hodgkin Lenfoma	15
2.2.11.3.1. Tanımlama	15
2.2.11.3.2. Epidemiyoloji	15
2.2.11.3.3. Tutulum Bölgeleri ve Klinik Özellikler	15
2.2.11.3.4. Histopatolojik ve İmmünofenotipik Özellikler	15
2.2.11.3.5. Prognostik Özellikler	16
2.2.11.4. Lenfosit Fakir Klasik Hodgkin Lenfoma	16
2.2.11.4.1. Tanımlama	16
2.2.11.4.2. Epidemiyoloji	17
2.2.11.4.3. Tutulum Bölgeleri ve Klinik Özellikler	17
2.2.11.4.4. Histopatolojik ve İmmünofenotipik Özellikler	17
2.2.11.4.5. Prognostik Özellikler	
2.3. NODÜLER LENFOSİT PREDOMİNANT HODGKİN LENFOMA	18
2.3.1. Tanım	18
2.3.2. Epidemiyoloji	18
2.3.3. Tutulum Bölgeleri ve Klinik Özellikler	18
2.3.4. Prekürsör Lezyonlar	18
2.3.5. Histopatoloji	19
2.3.6. İmmünofenotipik Özellikler	19
2.3.7. Genetik	20
2.3.8. Varsayılan hücre orijini	20

2.3.9. Prognostik Özellikler	20
2.4. COX-2	21
2.4.1. COX-2 ve Karsinogenez	21
2.4.2. Lenfomalarda COX-2 Ekspresyonu	21
2.4.3. COX-2 ile EBV ve BCL-2 İlişkileri	22
2.5. BCL-2	23
2.5.1. Apoptozda BCL-2'nin Rolü	23
2.5.2. Lenfomalarda BCL-2 Ekspresyonu	23
2.5.3. BCL-2 ve EBV İlişkisi	24
2.6. LMP-1	24
2.6.1. Klasik Hodgkin Lenfomada LMP-1 Ekspresyonu	24
3. MATERYAL VE METOD	26
3.1. Olgular	26
3.2. Doku mikroarray tekniği-DMA	26
3.3. İmmünohistokimyasal İnceleme ve Değerlendirme	27
3.4. Sağkalım Değerlendirmesi	28
3.5. İstatistiksel Analiz	28
4. BULGULAR	32
4.1. Klinik ve Morfolojik Bulgular	32
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	38
4.2.1. COX-2 ekspresyonu	38
4.2.2. BCL-2 ekspresyonu	44
4.2.3. LMP-1 ekspresyonu	48
4.2.4. COX-2, BCL-2 ve LMP-1 ekspresyonları arasındaki ilişki	52
4.2.5. Sağkalım Analizi	55
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	59
ÖZET	70
SUMMARY	71
KAYNAKLAR	72

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABHL	: Anaplastik büyük hücreli lenfoma
Apaf-1	: Apoptoz aktive edici faktör-1
Bax	: Bcl-2 ilişkili x proteini
BSAP	: B hücre spesifik aktivatör protein
Cox	: Cyclooxygenase
DMA	: Doku mikroarray tekniği
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EBNA	: Epstein Barr virüs nükleer antijen
EBV	: Epstein Barr virüs
EMA	: Epitelyal membran antijen
FISH	: Floresan in situ hibridizasyon
PG	: Prostaglandin
H-E	: Hematoksilen eozin
HL	: Hodgkin lenfoma
HRS	: Hodgkin-Reed Sternberg
IL	: İnterlökin
KHL	: Klasik Hodgkin lenfoma
LFKHL	: Lenfositten fakir klasik Hodgkin lenfoma
LMP	: Latent membran protein
LZKHL	: Lenfositten zengin klasik Hodgkin lenfoma
MHKHL	: Miks hücreli klasik Hodgkin lenfoma
NHL	: NonHodgkin lenfoma
NLPHL	: Nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfoma
NSAİİ	: Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar
NSKHL	: Nodüler sklerozan klasik Hodgkin lenfoma
PTGM	: Progresif transforme germinal merkezler
RS	: Reed Sternberg
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü-β
TNF	: Tümör nekrotizan faktör
TRAF	: TNF reseptör ilişkili faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

No	Başlık	Sayfa No
Şekil 1	KHL’de düşük ve yüksek evre ile sağkalım ilişkisi	56
Şekil 2	KHL’de dördü evre ile sağkalım ilişkisi	56
Şekil 3	KHL’de Cox-2 pozitif / negatifliği ile sağkalım ilişkisi	57
Şekil 4	MHKHL’de düşük ve yüksek evre ile sağkalım ilişkisi	58
Şekil 5	MHKHL’de Cox-2 ekspresyonu ile sağkalım ilişkisi	58

RESİMLER DİZİNİ

No	Başlık	Sayfa No
Resim 1	HRS hücrelerinde Cox-2 negatifliği (HE x 400)	29
Resim 2	HRS hücrelerinde Cox-2 pozitifliği (HE x 400)	29
Resim 3	HRS hücresinde Bcl-2 negatifliği (HE x 400)	30
Resim 4	HRS hücrelerinde Bcl-2 pozitifliği (HE x 400)	30
Resim 5	HRS hücrelerinde LMP-1 negatifliği (HE x 400)	31
Resim 6	HRS hücrelerinde yaygın LMP-1 pozitifliği (HE x 400)	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

No	Başlık	Sayfa No
Tablo 1	Geçmişten günümüze Hodgkin lenfoma sınıflamaları	4
Tablo 2	Hodgkin lenfomada Ann Arbour Evrelemesi	6
Tablo 3	KHL’de klinik parametrelere göre olguların dağılımı	32
Tablo 4	Histolojik alt tiplerin cinsiyet ile ilişkisi	33
Tablo 5	Histolojik alt tip ile yaş grubu ilişkisi	34
Tablo 6	Histolojik alt tiplerin evre ile ilişkisi	34
Tablo 7	Düşük ve yüksek evre ile histolojik alt tip ilişkisi	34
Tablo 8	KHL’da cinsiyet ile yaş grubu ilişkisi	35
Tablo 9	KHL’de cinsiyet ile düşük ve yüksek evre ilişkisi	36
Tablo 10	KHL’de düşük ve yüksek evrenin yaş grubu ile ilişkisi	35
Tablo 11	KHL’deki histolojik alt tipler ile klinik parametreler arasındaki ilişki	37
Tablo 12	Cox-2 ekspresyonu ile histolojik alt tip ilişkisi	38
Tablo 13	Cox-2 skorlaması ile histolojik alt tip ilişkisi	38
Tablo 14	KHL’de Cox-2 ekspresyonu ile cinsiyet ilişkisi	39
Tablo 15	KHL’de Cox-2 skorlamasının cinsiyet ile ilişkisi	39
Tablo 16	KHL’de Cox-2 ekspresyonu ile yaş grubu ilişkisi	40
Tablo 17	KHL’de Cox-2 ekspresyon skorlaması ile yaş grubu ilişkisi	40
Tablo 18	KHL’de Cox-2 ekspresyonu ile evre ilişkisi	41
Tablo 19	KHL’de Cox-2 ekspresyonu skorlaması ile evre ilişkisi	42
Tablo 20	Cox-2 ekspresyonu ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki	43
Tablo 21	KHL’de Bcl-2 ekspresyonu ile histolojik alt tip ilişkisi	44
Tablo 22	KHL’de Bcl-2 ekspresyonu ile cinsiyet ilişkisi	44
Tablo 23	KHL’de Bcl-2 ekspresyonu ile yaş grubu ilişkisi	45
Tablo 24	KHL’de Bcl-2 ekspresyonu ile evre ilişkisi	46
Tablo 25	Bcl-2 ekspresyonu ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki	47
Tablo 26	KHL’de LMP-1 ekspresyonu ile histolojik alt tip ilişkisi	48

Tablo 27	KHL’de LMP-1 ekspresyonu ile cinsiyet ilişkisi	48
Tablo 28	KHL’de LMP-1 ekspresyonu ile yaş grubu ilişkisi	49
Tablo 29	KHL’de LMP-1 ekspresyonu ile evre ilişkisi	50
Tablo 30	LMP-1 ekspresyonu ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki	51
Tablo 31	KHL’de Cox-2 ile Bcl-2 ekspresyonu ilişkisi	52
Tablo 32	KHL’de Cox-2 ile LMP-1 ekspresyonu arasındaki ilişki	53
Tablo 33	KHL’de LMP-1 ile Bcl-2 ekspresyonu arasındaki ilişki	53
Tablo 34	KHL’de Cox-Regresyon analizi sonuçları	57
Tablo 35	MHKHL’de Cox-Regresyon analizi sonuçları	58

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lenfomalar genel olarak histolojik ve immünofenotip özellikleri ve klinik davranışlarına göre Hodgkin lenfoma (HL) ve NonHodgkin lenfoma (NHL) olarak ayrılır (1). Hodgkin lenfoma kompleks bir lenfoproliferatif neoplazidir. Morfolojik ve immünofenotipik özelliklerine göre Klasik Hodgkin lenfoma (KHL) ve Nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfomaya (NLPHL) ayrılır. KHL’de histolojik tanı Hodgkin-Reed Sternberg (HRS) hücrelerinin varlığına bağlıdır. Reed Sternberg (RS) hücreleri stromada reaktif lenfositler, plazma hücreleri, histiositler, nötrofiller, eozinofillerden oluşan hücrenel bir infiltrat ile çevrelenmiştir. Neoplastik hücre popülasyonu olduğu kabul edilen mononükleer Hodgkin ve multinükleer Hodgkin-Reed Sternberg hücreleri tutulan dokunun %1’inden azını oluşturur (2). Diğer birçok malign tümörün aksine, KHL çok sayıda proliferatif tümör hücrelerinden oluşmaz. Tersine HRS hücreleri dağınıktır ve birçok aktive non-neoplastik lenfositler ile çevrilmiştir (3).

Hodgkin Lenfomanın nedeni ve patogenezi henüz bilinmemektedir. En fazla tedavi edilebilir malignansiler arasında olmasına rağmen, bu hastalık için en iyi başlangıç tedavi seçeneğinin uzun dönem sonuçları hakkında anlaşmazlık vardır. İlerlemiş hastalığı olanların yaklaşık %30-40’ı primer rezistan veya relaps yapan hastalık olmadığı halde agresif tedavi yaklaşımına ihtiyaç duyar. Diğer taraftan yoğun kemoterapi kombinasyonu, sekonder malignansileri de içeren uzun dönem morbiditede artmış risk taşır. Klinik gidişatı daha iyi tahmin edebilmek için biyolojik özellikler mümkün olduğunca tanımlanmaya çalışılmaktadır. HL’nin patogenezi hala çok iyi anlaşılammıştır. Hücre siklusunu ve apoptozu kontrol eden yollardan sorumlu değişiklikleri içerdiğine dair güçlü bulgular vardır. Bu anlamda Bcl-2 ekspresyonunun Hodgkin lenfoma dokularının büyük bir bölümünde Hodgkin-Reed Sternberg hücrelerinde saptanabileceğine dair yayınlar vardır (4).

“Cyclooxygenase” (Cox) hız kısıtlayıcı bir enzimdir ve inflamatuvar olaylarda önemli rol oynar. Araşidonik asidin prostaglandinler ve tromboksana dönüşümünü katalize eder. İki izoformundan biri olan Cox-2, bakteriyel endotoksin, sitokin, büyüme faktörleri ve tümör “promoterları” ile indüklenir. Cox-2’nin karsinogenez ve tümör ilerlemesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Çalışmalarda Cox-2’nin

prostaglandin (PG) E2 sentezinin upregülasyonu yoluyla Bcl-2 mRNA ve proteinin artmış ekspresyonu yoluyla tümör hücrelerinde apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir. Selektif Cox-2 inhibitörleri veya nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçların (NSAİİ) tümör hücre büyümesini ve/veya anjiogenezi inhibe edebileceği gösterilmiştir (5).

Son birkaç on yıl boyunca yapılmış çalışmalar ile HL'da Epstein-Barr virüs (EBV) ilişkisi gösterilmiştir. Batı ülkelerinde HL'lı hastaların yaklaşık yarısında EBV latent gen ve proteinlerinin varlığını bildiren çok sayıda yayınlar bulunmaktadır. HL'daki genetik değişiklikleri daha kesin olarak bulma girişimleri karşılığını vermemiştir. Bununla birlikte yakın zamandaki göstergeler apoptozu içeren genlerin ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Eldeki bilgiler HL patogenezinde kompleks birçok faktörün rol oynadığını göstermektedir. Multipl parametreleri analize eden çalışmalar gerekmektedir (6).

Literatürde Cox-2'nin karsinogenez ve tümör ilerlemesi ile ilişkili olabileceği değişik epitelyal karsinomlarda bildirilmiş olup, lenfoma patogenezindeki yeri ve önemi ile ilgili çalışmalar çok azdır. Bu çalışmalar genellikle NHL serilerinde yapılmış olup KHL'de ayrıntılı yapılmış vaka serileri bulunmamaktadır. Ayrıca KHL'nin etiyolojik olarak EBV ile ilişkisi ve HRS hücrelerinin birtakım yollarla apoptozdan kurtuldukları bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızda SDÜ Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı almış KHL olgularında immünohistokimyasal yöntemle Cox-2, Bcl-2 ve LMP-1 ekspresyonlarının yeri ve öneminin araştırılması planlanmıştır. Arşiv parafin bloklarına ait kesitlerde Cox-2, Bcl-2 ve LMP-1 antikorları boyamaları yapılacak, bulgular olguların klinik ve patolojik verileriyle birlikte değerlendirilerek bu belirleyicilerin KHL'deki yeri, klinikopatolojik parametreler ve prognoz ile ilişkileri incelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HODGKİN LENFOMA

2.1.1. Tanımlama ve Sınıflandırma

Hodgkin lenfoma, ilk olarak Thomas Hodgkin tarafından 1832 yılında tanımlanmıştır (7, 8). Thomas Hodgkin Reed Sternberg hücrelerini “nadir büyük anormal hücreler” olarak karakterize etmiştir (9). Daha sonra Sir Samuel Wilks 1865 yılında ilk defa bu hastalığı “Hodgkin hastalığı” olarak isimlendirmiştir. Bu hastalığın histolojik özellikleri 1878 yılında Langhans ve Greenfield tarafından tanımlanmıştır. Hodgkin hastalığı tanısı konulabilmesi için dev hücrelerin gerekliliği 1898 yılında Carl Sternberg ve 1902 yılında Dorothy Reed tarafından belirtilmiştir. Günümüzde bu dev hücrelerin HL’deki malign hücreler olan RS hücreleri olduğu bilinmektedir. Sternberg, HL’nin o zamanlar sık görülen bir hastalık olan tüberküloz ile ilişkili olduğunu düşünmüştür. Reed ise HL’nin inflamatuvar bir olay olduğunu, tüberküloz ile ilişkili olmadığını öne sürmüştür (8). Hastalık aynı zamanda artık kullanımda olmayan bir terim olan “lenfogramüloz” olarak da adlandırılmıştır (10). HL’nin infeksiyöz veya malign bir hastalık olup olmadığına yönelik yıllar boyunca yapılan çalışmalarda HL’a neden olan infeksiyöz bir ajan bulunamamıştır. Ancak 1960 yılında yapılan sitogenetik çalışmalarda RS hücrelerinin anöploid ve klonal olduğu gösterildikten sonra malign olduğu anlaşılmıştır (8). RS hücrelerinin orijininin bir lenfoid hücre (sıklıkla B hücre tipi) olduğu saptandığı için, “Hodgkin lenfoma” terimi “Hodgkin hastalığı” yerine kullanılmaktadır.

Hodgkin lenfoma ilk olarak 1944 yılında Jackson ve Parker tarafından sınıflandırılmıştır, ancak modern sınıflama Lukes ve Butler’in 1964 yılında yaptığı sınıflamaya dayanır (10) (Tablo 1). Son 20 yıldaki biyolojik ve klinik çalışmalar sonucunda 2001 ve 2008 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflamalarında HL’nin iki tipten oluştuğu kabul edilmiştir. Bunlar;

1- Klasik Hodgkin lenfoma

2- Nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfoma

Bu iki tipin klinik özellikleri ve davranışları, morfoloji, immünofenotip, neoplastik hücrelerin immünglobulin (Ig) transkripsiyonu ve hücresel zeminlerindeki içerik ile farklılık gösterir.

Tablo 1: Geçmişten günümüze Hodgkin lenfoma sınıflamalarıJackson and Parker sınıflama (1944)

1. Paragranülom
2. Granülom
3. Sarkom

Lukes and Butler sınıflama (1964)

1. Lenfositik ve/veya Histiyositik (nodüler, diffüz)
2. Nodüler Sklerozan
3. Miks Hücreli
4. Diffüz Fibrozis
5. Retiküler

Rye sınıflama (1965)

1. Lenfosit Predominant
2. Nodüler Sklerozan
3. Miks Hücreli

REAL sınıflama (1994)

1. Nodüler Lenfosit Predominant
Nodüler/Diffüz
2. Klasik HL
Nodüler Sklerozan
Miks Hücreli
Lenfositten Fakir
Lenfositten Zengin

DSÖ (2001/2008)

1. Nodüler Lenfosit Predominant HL (NLPHL)
2. Klasik HL (KHL)
Nodüler Sklerozan KHL
Lenfositten Zengin KHL
Miks Hücreli KHL
Lenfositten Fakir KHL

Diğer taraftan KHL'de morfolojik ve klinik farklılıklar gösteren 4 alt tipi ayırt edilmiştir:

- 1- Nodüler sklerozan KHL
- 2- Miks hücreli KHL
- 3- Lenfositten zengin KHL
- 4- Lenfositten fakir KHL

Bu alt tipler; tutulum bölgeleri, klinik özellikleri, büyüme paterni, fibrozis varlığı, hücresel zemin içeriği, tümör hücrelerinin sayısı ve/veya atipi dereceleri ve EBV enfeksiyonu sıklığına göre farklılık gösterir, fakat tümör hücrelerinin immünofenotipi bu 4 varyantta da aynıdır (10).

2.1.2. Evreleme

Hodgkin lenfomada hastaların evrenmesi, hastalığın yaygınlığını tespit etmede, hastalara verilecek terapötik ajanların belirlenmesinde ve hastaların takibinde en önemli parametredir. Ann Arbour evreleme sistemi olarak bilinen klinik evreleme 1971 yılında kabul edilmiştir (8). Daha sonra İngiltere Cotswold'daki toplantıda bu evreleme modifiye edilip Modifiye (Costwold) Ann Arbour evrelemesi olarak adlandırılmıştır (1,8). Bu revizyon ile hastalığın yaygınlığını değerlendirmede yeni tanısal teknikleri de içermektedir (8) (Tablo 2).

2.2. KLASİK HODGKİN LENFOMA

Değişik miktarda neoplastik olmayan küçük lenfositler, eozinofiller, nötrofiller, histiositler, plazma hücreleri, fibroblastlar ve kollajen fibrillerini içeren infiltrata yerleşmiş mononükleer Hodgkin hücreler ve multinükleer Reed Sternberg hücrelerinden oluşan monoklonal bir lenfoid neoplazmdir. Reaktif infiltratın özelliklerine ve HRS hücrelerin morfolojisine dayanarak 4 histolojik alt tip ayırt edilir:

- 1- Nodüler sklerozan KHL (NSKHL)
- 2- Miks hücreli KHL (MHKHL)
- 3- Lenfositten zengin KHL (LZKHL)
- 4- Lenfositten fakir KHL (LFKHL)

Bu histolojik alt tiplerde mononükleer ve multinükleer HRS hücrelerinin immünofenotipik ve genetik özellikleri benzerdir fakat klinik özellikleri ve EBV ile ilişkileri farklılık gösterir (1).

Tablo 2: Hodgkin lenfomada Ann Arbour Evrelemesi (10, 11)

<p>Evre I - Tek bir lenf nodu bölgesi tutulumu (I)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tek bir ekstralenfatik organ / bölge tutulumu (IE) (Örn. Dalak, timus, Waldeyer halkası) <p>Evre II - Diyafragmanın aynı tarafında iki / daha fazla lenf nodu bölgesi tutulumu (II)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Beraberinde sınırlı ekstralenfatik organ/doku tutulumu (IIE) (Mediastinum tek bir bölgedir, hiler lenf nodlarına lateralizedir. Anatomik bölgelerin sayısı son ek ile belirtilmektedir, örn. II3.) <p>Evre III - Diyafragmanın her iki tarafında lenf nodu bölge tutulumu (III)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Beraberinde dalak tutulumu (IIIS) - Beraberinde ekstralenfatik organ/bölge tutulumu (IIIE) - Her ikisi birden (IIIES) <p>Evre IV - Lenfatik tutulumun olduğu veya olmadığı durumda multipl yada yaygın odaklar halinde ekstralenfatik organ/doku tutulumunun bulunması</p>

2.2.1. Epidemiyoloji

Klasik Hodgkin lenfoma tüm Hodgkin lenfomaların %95'ini oluşturur (1). Gelişmekte olan ülkelerde 1.pik en yüksek sıklıkla çocuklarda, 2. pik 15-40 yaşlarında, 3. pik en az sıklıkla ileri yaşlarda görülür. ABD'de bimodal yaş eğrisi vardır, 15-35 ve 70'li yaşlar iki kez pik yapar (7). İnfeksiyöz mononükleoz öyküsü olan hastalarda HL yüksek insidanstadır. Hem ailesel hem coğrafik kümelenme tanımlanmıştır (10).

2.2.2. Tutulum Bölgeleri ve Klinik Özellikler

Klasik Hodgkin lenfoma sıklıkla servikal bölge lenf nodlarını (vakaların %75'i) tutar. Bunu mediastinal, aksiller ve paraaortik bölge lenf nodları takip eder. Mezenterik ve epitroklear lenf nodları gibi aksiyel olmayan lenf nodları grupları nadiren tutulur. Hastaların %55'inin lokalize hastalığı vardır (evre I ve II). Hastaların, çoğunluğu NSKHL olan yaklaşık %60'ının mediastinal tutulumu vardır. Dalak tutulumu sık değildir (%20) ve ekstranodal yayılımın artmış riski ile ilişkilidir. Kemik iliği tutulumu daha az siktir. Kemik iliğinde lenfatikler olmadığından, kemik

iliği infiltrasyonu hastalığın vasküler yayılımını gösterir (evre IV). Anatomik yayılım KHL'nin histolojik alt tiplerine göre değişir (10).

Hastalar, genellikle lenf nodu bulunan alanların bir veya iki bölgesinde lokalize ağrısız periferal lenfadenopati ile başvururlar. Mediastinal tutulum sıklıkla nodüler sklerozan alt tipte görülürken, abdominal ve splenik tutulum miks hücreli tipte daha sıktır. Ateş, gece terlemesi ve belirgin kilo kaybını içeren sistemik semptomlar (B semptomları) hastaların yaklaşık %40'ında vardır (10, 11). Kaşıntı da sıktır. Genellikle evre I veya II'de başvurur, evre III veya IV'de sistemik semptomlarla başvurur (11).

2.2.3. Etyoloji

EBV'nün KHL patogeneğinde rol oynadığı varsayılmaktadır. EBV vakalarının sadece belli bir oranında bulunur, fakat diğer virüslerin aranması başarısız olmuştur. HIV enfeksiyonu gibi immun yetmezlik durumlarında immünsürelansın kaybı EBV ilişkili HL gelişimini etkileyebilir (10).

2.2.4. Histopatolojik Özellikler

Lenf nodları büyümüştür, kapsüllüdür ve kesit yüzeyi balık eti kıvamındadır. Nodüler sklerozan alt tipte belirgin nodülerite, yoğun fibrotik bantlar ve kalınlaşmış bir kapsül vardır. Dalak tutulumu genellikle beyaz pulpada dağınık nodülleri gösterir. Bazen çok büyük kitleler görülür, bunlar nodüler sklerozan alt tipteki fibröz bantları gösterebilir. Timustaki HL kistik dejenerasyon ile ilişkili olabilir (10).

Lenf nodu yapısı, değişen sayıda HRS hücreleri ile karışık zengin inflamatuvar zemin ile silinmiştir. Klasik tanısal RS hücreleri büyüktür, geniş hafif bazofilik sitoplazması ve iki nükleer lobu veya nükleusu vardır. Nükleus büyüktür ve belirgin nükleer membran, soluk kromatin ve genellikle belirgin bir eozinofilik nükleol ile sıklıkla yuvarlak konturludur. Tanısal RS hücrelerinin 2 ayrı nükleer lobda en azından 2 nükleolü olması gerekir. Mononükleer varyantlar Hodgkin hücreleri olarak adlandırılır. Bazı HRS hücrelerinin yoğun sitoplazması ve piknotik nükleusu olabilir. Bu varyantlar mummified hücreler olarak bilinir. Neoplastik hücrelerin çoğu HRS hücrelerinin prototipi değildir. Laküner RS varyantı, nodüler sklerozan HL'nin karakteristiğidir. Neoplastik hücreler hücreyel infiltratın sadece küçük bir bölümünü temsil eder, sıklıkla tipik olarak %0,1-10 arasında değişir. Reaktif hücreyel infiltratın bileşimi histolojik alt tipe göre değişir. İkincil bölgelerin tutulumu (kemik iliği ve

karaciğer) CD30 ve/veya CD15 pozitif atipik mononükleer Hodgkin hücrelerin uygun inflamatuvar zeminde tanımlanmasına dayanır, başka bir bölgede KHL tanısı almış hastada prototipik RS hücreleri gerekli değildir (10).

2.2.5. İmmüfenotipik Özellikler

Hodgkin-Reed Sternberg hücrelerinde CD30 pozitifdir, vakaların çoğunda (yaklaşık %75-80'inde) CD15 pozitifdir. Tipik olarak bu pozitiflik membranöz veya golgi zon boyanması şeklindedir. CD15 pozitifliği gösteren HRS hücreleri neoplastik hücrelerin az bir kısmında pozitifdir. CD45 negatiftir ve daima J zinciri, CD75 ve CD68 molekülünün PG-M1 epitopu gibi makrofaj spesifik belirleyiciler negatiftir. Vakaların yaklaşık %40'ında CD20 saptanabilir, fakat genellikle değişken yoğunluktadır ve neoplastik hücrelerin sadece az bir kısmında vardır. B hücreleri ile ilişkili CD79a antijeni daha az sıklıkta vardır. HRS hücrelerinin B hücre doğası daha ileri inceleme ile vakaların yaklaşık %90'ında B hücre spesifik aktivatör protein (BSAP) için immüpozitifliği ile gösterilebilir. HRS hücrelerinin BSAP için immüboyanması, reaktif B hücrelerine göre daha zayıftır, bu özellik BSAP pozitif HRS hücrelerini kolaylıkla tanımlanabilir hale getirir. BSAP, B hücrelerine özel transkripsiyon faktörüdür ve PAX5 geninin ürünüdür. EBV ile kodlanmış latent membran proteini (LMP-1) histolojik alt tip ve epidemiyolojik faktörlere göre değişen derecede eksprese edilir. HRS hücrelerinin az bir kısmı tarafından bir veya daha fazla T hücre antijenlerinin ekspresyonu (genellikle zayıf) bazı vakalarda rastlanabilir. Buna rağmen bunu değerlendirmek HRS hücrelerini genellikle çevreleyen T hücreleri nedeniyle sıklıkla zordur. Birkaç T hücre antijeni pozitif klasik HL vakaları T hücre reseptör düzenlemesi göstermez, fakat bunun yerine immünglobulin gen yeniden düzenlenmesi gösterir. Böylece T hücre antijenlerinin ekspresyonu sıklıkla aberrandır. Epitelyal membran antijeninin (EMA) ekspresyonu nadirdir (vakaların %5'inden daha az) ve genellikle zayıftır. Bir başka karakteristik bulgu transkripsiyon faktör Oct-2 ve/veya bunun ko-aktivatörü BOB-1'in yokluğudur. BOB-1 koaktivatörü yokluğu immünglobulin transkripsiyon indüksiyonu için kritiktir. Birçok HRS hücreleri proliferasyon ilişkili nükleer antijen Ki-67'yi eksprese eder (10).

Neoplastik hücrelerden zengin KHL vakaları anaplastik büyük hücreli lenfomaya (ABHL) benzeyebilir. KHL olarak tanımlanmalarında neoplastik

hücrelerde BSAP (PAX5 geni tarafından kodlanır) pozitifliğinin gösterilmesi yardımcıdır. Çünkü bu protein ABHL'da negatiftir. EMA ve ALK kinaz proteini için negatiflik de yardımcı belirleyicilerdir. EBV ile kodlanmış LMP-1'in bulunması da KHL'yi destekler. En zor ayırıcı tanı anaplastik morfoloji gösteren büyük B hücreli lenfoma iledir. Böyle vakalar ve KHL arasında gerçek bir biyolojik örtüşme olabilir (10).

KHL'nin %98'inden daha fazlasında neoplastik hücreler germinal merkez differansiyasyon evresinde matür B hücrelerinden türerler. Nadir vakalarda bunlar periferel (post-timik) T hücrelerinden türerler (10).

2.2.6. Sitokinler ve Kemokinler

Klasik Hodgkin lenfoma, sitokin ve kemokinlerin ve/veya bunların reseptörlerinin aşırı ekspresyonları ve anormal paternleri ile ilişkilidir. HRS hücreleri interlökin-2 (IL-2), IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13 ve IL-13 reseptörü, granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör, lenfotoksin-a, transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), eotaksin ve CC kemokin TARC'ı içeren çeşitli sitokin ve kemokinleri eksprese edebilir. Anormal sitokin ve kemokin ekspresyonu muhtemelen KHL'de bulunan bol miktarda miks iltihabi hücre infiltrasyonundan dolayıdır. Eotaksin aşırı ekspresyonu infiltrattaki aşırı eozinofil miktarı ile koreledir. TGF- β ekspresyonu fibrozisi gösterebilir. CC kemokin TARC, infiltre T hücre popülasyonundaki Th2 hücre baskınlığından sorumludur (10).

2.2.7. Genetik

2.2.7.1. Antijen reseptör genleri

Hodgkin-Reed Sternberg hücreleri vakaların %98'inden fazlasında monoklonal Ig gen yeniden düzenlenmeleri ve nadir vakalarda monoklonal T hücre reseptör yeniden düzenlenmeleri içerir. T hücre genotipli sadece 4 vaka tanımlanmıştır (3 vaka tek hücre polimeraz zincir reaksiyonu ile ortaya çıkarılmıştır). Monoklonal yeniden düzenlenmeleri genellikle tüm doku DNA'sında değil, sadece izole tek HRS hücrelerinin DNA'sında bulunabilir. KHL'nin T hücre formununun aranması periferel T hücreli lenfoma KHL'yi taklit edebileceğinden güçleşebilir. Buna rağmen T hücreli lenfomalarda T hücre reseptör genlerinin monoklonal yeniden düzenlenmesi genellikle tüm doku DNA'sında gösterilebilir (10).

2.2.7.2. İmmünglobulin genlerinin somatik mutasyonları

Tümör hücrelerinin yeniden düzenlenen Ig genleri, Ig ağır zincir genlerinin değişen bölgesinde genellikle devam eden mutasyon bulgusu göstermeden yüksek bir somatik mutasyon yükü barındırır. Bu bulgular germinal merkez B hücrelerinden HRS hücre deviasyonu veya bunların neslini gösterir. Çünkü somatik ağır zincir (VH) gen mutasyonları, B hücreleri germinal merkez reaksiyonuna katıldığı zaman ortaya çıkar. KHL ve folliküler NonHodgkin lenfomayı içeren birleşik lenfomalarla yapılan çalışma yaygın bir prekürsör hücrenin tanımlanmasına yol açmıştır. Bu prekürsör hücre VH genlerinde somatik mutasyon taşıdığı gösterilmiştir ve böylece bir germinal merkez B hücresine karşılık gelmektedir. Bu bulgu, B hücre serisindeki HRS hücrelerinin post-germinal merkez B hücrelerinden değil, germinal merkez B hücrelerinden türediği görüşünü destekler (10).

2.2.7.3. İmmünglobulin transkripsiyonunun inaktivasyonu

Önceki KHL'deki tek hücre çalışmaları, HRS hücrelerinin stop kodonlarını oluşturan yenileme mutasyonlarının kazancına bağlı fonksiyonel immünglobulin molekülleri üretme yeteneğinde olmadığı sonucuna vardı. Buna rağmen in situ hibridizasyon çalışmaları ve daha yeni tek hücre araştırmaları, bozuk immünglobulin gen mutasyonlarının varlığı (%25) veya yokluğuna (%75) bakmaksızın tüm vakalarda HRS hücrelerinde immünglobulin mRNA transkriptlerinin yokluğunu gösterdi. Başka çalışmalar immünglobulin transkripsiyonunun yokluğunun immünglobulin promoter inaktivasyonu sonucu oluştuğuna dair bulgular sağlamıştır. Bu durum oktamer bağımlı transkripsiyon faktör Oct-2 ve/veya bunun ko-aktivatörü BOB-1'in yokluğunun sonucu oluşmuş gibi görünmektedir. Oct-2 ve/veya BOB-1'in yokluğu genellikle NLPHL'ı da içeren diğer B hücre lenfomalarında görülmez (10).

2.2.7.4. Apoptozun blokajı

İmmünglobulin eksprese etme yeteneğini kaybeden B hücreleri hızlıca apoptoza gider. Ig üretmeyen HRS hücreleri apoptozdan ölmediğine göre, bu hücrelerde apoptotik yol bloke olmuştur. KHL'de apoptozu önleyen mekanizmalar henüz aydınlanmamıştır. Buna rağmen nükleer transkripsiyon faktör NFkB'nin HRS hücrelerinde yapısal olarak aktive olduğu bulunmuştur. NFkB'nin inaktivasyonu ile yeniden geri gelmektedir. NFkB'nin HRS hücrelerindeki ısrarlı aktivasyonu, NFkB'nin doğal inhibitörleri olan IκB ailesi üyelerinin defektleri (örneğin

mutasyonlar) veya I κ B kinazın aberran aktivasyonu tarafından oluşabilir. NF κ B aktivasyonuna aracılık eden, apoptozdan koruyan ve HRS hücrelerinde güçlü bir şekilde aşırı eksprese edilen diğer bir molekül TNF reseptör ilişkili faktör (TRAF) 1 molekülüdür (10).

Klasik Hodgkin lenfoma patogenezinde dahil olan muhtemel diğer genler; EBV ile kodlanmış LMP-1 ve p53'dür. EBV infeksiyonu KHL'de LMP-1'in düzenli ekspresyonunu indükler. LMP-1 transforme edici ve antiapoptotik potansiyele sahiptir. Buna rağmen EBV infeksiyonu vakaların sadece bir bölümünde vardır ve böylece apoptozun önlenmesinin tek nedeni olamaz. Buna rağmen bir kofaktör olabilir. P53'ün sık aşırı ekspresyonuna rağmen, TP53 mutasyonları tek hücre seviyesinde tanımlanmamıştır (10).

2.2.8. Epstein-Barr Virüs İnfeksiyonu

EBV insan herpes virüsüdür, çeşitli lenfoid ve epitelyal malignansiler ile ilişkilidir. Yakın zamanda uluslararası kanser inceleme ve araştırma ajansı tarafından grup 1 karsinojen olarak sınıflandırılmıştır. EBV değişen sıklıklarda Burkitt lenfoma, nazofarengeal karsinom, Hodgkin lenfoma, sinonazal ve periferik T hücre lenfomaları, lenfoepitelyoma, immünsuprese hastalarda gastrik karsinom, leiomyosarkom, bazı baş boyun kanserleri ve bazı coğrafik alanlarda natural killer (NK) -T-hücre nasil lenfomalarda tanımlanmıştır (12). EBV, primer B lenfositleri in vitro enfekte eder ve sonsuz proliferasyonla olacak şekilde dönüştürürler. EBV ile biçimi değiştirilmiş (dönüştürülmüş) B lenfositleri belli sayıda EBV gen ürünleri eksprese eder. Bunlar 6 nükleer antijen (EBNA1 -Epstein-Barr virus nükleer antijen1-, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C ve EBNA3L), 3 membran proteini (LMP1, LMP2A ve LMP2B), EBV kodlanmış küçük RNA'lar (EBER1, EBER2 v.b.) ve Bam HI A bölgesinden kopyalar (BARF0) (13).

EBV'nin HRS hücrelerinde prevalansı histolojik alt tip ve coğrafik bölgelere göre değişir. En sık MHKHL'de (yaklaşık %75) bulunur, en düşük insidans(%10-40) NSKHL'dedir. Gelişmekte olan bölgelerde ve insan immün yetmezlik virüsü ile enfekte hastalarda EBV infeksiyonu daha siktir, %100'e yaklaşır. EBV soy tipleri farklı coğrafik bölgeler arasında da değişir. Gelişmiş ülkelerde soy 1, gelişmekte olan ülkelerde soy 2 baskındır. Her iki soy tarafından dual infeksiyon gelişmekte olan ülkelerde daha siktir. Tanı esnasında EBV için pozitif olan Hodgkin lenfoma

genellikle relaps sırasında da aynı EBV soyu persistansı ile pozitifdir. EBV ile infekte HRS hücreleri LMP-1 ve EBNA-1 eksprese eder, EBNA-2 eksprese etmez. Bu ekspresyon paterni latent tip 2 EBV infeksiyonu özelliğidir (10).

2.2.9. Sitogenetik Özellikler

Geleneksel sitogenetik ve floresan insitu hibridizasyon (FISH) çalışmaları neoplastik hücrelerin çok çekirdekli olması ile tutarlı olarak anöplöidi ve hipertetraploidi gösterir. Buna rağmen bu teknikler KHL'de rekürren ve spesifik kromozomal değişiklikleri gösteremez. Oysa karşılaştırmalı genomik hibridizasyon kromozom kolunun 2p, 9p ve 12q'da kromozomal alt bölgede rekürren kazançları ve kromozomal bantlar 4p16, 4q23-q24 ve 9p23-p24'deki farklı yüksek seviye amplifikasyonları gösterir. HRS hücrelerinde t(14;18) ve t(2,5) translokasyonları yoktur (10).

2.4.13. Prognostik Özellikler

Modern radyasyon ve kemoterapi tedavileri HL'lı vakaların büyük çoğunluğunu tedavi edilebilir yapmıştır. Kombine patolojik ve klinik evre, tedavi protokülü belirler. Modern tedavi protokolleri öncesindeki yıllarda histolojik tip ile sağkalım süresi arasında güçlü bir ilişki vardı. Bugün evre ve sistemik semptomların varlığı prediktif faktör olarak histolojik alt tipten çok daha önemli parametrelerdir (10).

2.2.11. KLASİK HODGKİN LENFOMANIN HİSTOLOJİK ALT TİPLERİ

2.2.11.1. NODÜLER SKLEROZAN KLASİK HODGKİN LENFOMA

2.2.11.1.1. Tanımlama

Nodüler sklerozan klasik Hodgkin lenfoma, KHL'nin bir alt tipidir. En azından bir nodülü saran kollajen bantlar ve laküner tip HRS hücreleri vardır (10).

2.2.11.1.2. Epidemiyoloji

Nodüler sklerozan klasik Hodgkin lenfoma, KHL'nin yaklaşık %70'ini oluşturur. Ortalama yaş 28'dir. KHL tipleri arasında erkek baskınlığı olmayan bir tipidir; erkek:kadın oranı yaklaşık 1:1'dir (10).

2.2.11.1.3. Tutulum Bölgeleri ve Klinik Özellikler

Mediastinal tutulum vakaların %80'inde oluşur, kitlesel hastalık %54, dalak ve/veya akciğer tutulumu %10 ve kemik iliği tutulumu %3'dür (10).

Birçok hastada evre II hastalık vardır. B semptomları vakaların yaklaşık %40'ında karşılaşırlar (10).

2.2.11.1.4. Histopatolojik ve İmmünofenotipik Özellikler

Lenf nodları, KHL ile birlikte nodüler büyüme paterni, kollajen bantlar ve laküner hücreler içerir. Geniş, fibroblasttan fakir, kollajen bantlar en azından bir nodülü çevreler. Bu fibrotik yapı genellikle kalınlaşmış lenf nodu kapsülü ile ilişkilidir. Değişken sayıda HRS hücreleri, zeminde küçük lenfositler, eozinofiller ve diğer neoplastik olmayan inflamatuvar hücreleri içerir. Bu alt tipteki HRS hücreleri diğer tipteki KHL'ye göre daha küçük loblu lobüle nükleus ile daha az belirgin nükleol içermeye eğilimindedir. Formalin ile fikse edilmiş dokularda HRS hücrelerinin sitoplazması sıklıkla sitoplazmik membranın retraksiyonunu gösterir, böylece hücreler lakun içinde oturuyor görünümündedir. Bu nedenle bu hücreler laküner hücreler olarak isimlendirilir. Laküner hücreler hücresel agregatlar oluşturabilir, bunlar bazen nodüllerdeki nekrotik alanlar ile yakın ilişkilidir. Agregatlar çok belirgin olduğunda NSKHL sınıfta varyant terimi kullanılmaktadır. Çok sayıda eozinofiller ve daha az nötrofiller bulunur (10).

The British National Lymphomas Investigation, NSKHL için bir dereceleme sistemi oluşturmuştur. Derece 1'de %75 veya daha fazla nodül; lenfositten zengin, miks hücreli veya fibrohistiositik zeminde, dağınık HRS hücreleri içerir. Derece 2'de

nodüllerin en az %25'i artmış sayıda HRS hücreleri içerir (x40 büyük büyütme alanını dolduran hücre tabakası olarak tanımlanır). Dereceleme rutin klinik amaçlar için istenmez, fakat araştırmalarda kullanılır. Bu çalışmalarda lenfositten fakir nodüler skleroz olarak tanımlananın karşılığı Derece 2 NSKHL'dir (10).

Malign hücreler KHL fenotipi gösterirler. EBV kodlanmış LMP-1 diğer alt tiplere göre daha az sıklıkla (%10-40) eksprese edilir (10).

2.2.11.1.5. Prognostik Özellikler

Nodüler sklerozan klasik Hodgkin lenfomanın prognozu miks hücreli ve lenfositten fakir alt tiplere göre biraz daha iyidir, bu durum kısmen düşük evre hastalık esnasında tanı konulma eğilimine bağlıdır. Yaygın mediastinal hastalık negatif bir risk faktörüdür (10).

2.2.11.2. MİKS HÜCRELİ KLASİK HODGKİN LENFOMA

2.2.11.2.1. Tanımlama

Klasik Hodgkin lenfomanın alt tipi olan MHKHL, nodüler sklerozan fibrozis olmaksızın diffüz veya belirsiz nodüler miks inflamatuvar zeminde dağılık klasik HRS hücreleri içerir (10).

2.2.11.2.2. Epidemiyoloji

Miks hücreli alt tip KHL'nin yaklaşık %20-25'ini oluşturmaktadır. MHKHL HIV enfeksiyonlu hastalarda ve gelişmekte olan ülkelerde daha siktir. Bimodal yaş dağılımı görülmez. Ortalama yaş 37 yıldır ve yaklaşık %70'i erkektir (10).

2.2.11.2.3. Tutulum Bölgeleri ve Klinik Özellikler

Miks hücreli klasik Hodgkin lenfoma, sıklıkla evre III veya evre IV hastalığı esnasında tanı alır. B semptomları siktir. Periferik lenf nodları sıklıkla tutulur, fakat mediastinal tutulum nadirdir. Dalak %30, kemik iliği %10, karaciğer %3 ve diğer organlar %1-3 sıklıkla tutulur (10).

2.2.11.2.4. Histopatolojik ve İmmünofenotipik Özellikler

Lenf nodu yapısı genellikle silinmiştir, buna rağmen bazı olgularda interfolliküler bir büyüme paterni görülebilir. İnterstisyel fibrozis olabilir, fakat lenf nodu kapsülü kalınlaşmamıştır. NSKHL'de görülen kalın fibröz bantlar yoktur. HRS hücreleri görünüm olarak tipiktir. Zemindeki hücreler çeşitli hücre tiplerinden oluşur, bu karışım büyük oranda değişir. Lenfositler, eozinofiller, nötrofiller, histiositler ve plazma hücreleri genellikle vardır. Bu hücre tiplerinden biri baskın olabilir.

Histiositler güçlü epiteloid differansiyasyon gösterebilir ve granulom benzeri kümeler oluşturabilir (10).

Malign HRS hücreleri KHL fenotipi gösterirler. EBV kodlanmış LMP-1 ekspresyonu, nodüler sklerozan ve lenfositten zengin KHL'ye göre daha sıklıkla eksprese edilebilir (yaklaşık vakaların %75'inde) (10).

2.2.11.2.5. Prognostik Özellikler

Modern tedaviye girişten önce, MHKHL'nin nodüler sklerozandan daha kötü, lenfositten fakir KHL'den daha iyi bir prognozu vardı. Şimdiki rejimde bu farklılıklar büyük oranda kayboldu (10).

2.2.11.3. LENFOSİTTEN ZENGİN KLASİK HODGKİN LENFOMA

2.2.11.3.1. Tanımlama

Lenfositten zengin klasik Hodgkin lenfoma, KHL'nin bir alt tipidir. Dağınık HRS hücreleri ve nodüler (sıklıkla) veya diffüz hücresel zeminde bol miktarda küçük lenfositler içerisinde olup nötrofil ve eozinofillerin yokluğu ile karakterizedir (10).

2.2.11.3.2. Epidemiyoloji

Lenfositten zengin klasik Hodgkin lenfoma, tüm KHL'nin yaklaşık %5'ini oluşturur, NLPHL ile benzer sıklıktadır. Ortalama yaş diğer KHL alt tiplerine ve NLPHL'e göre daha yüksektir. Hastaların yaklaşık %70'i erkektir (10).

2.2.11.3.3. Tutulum Bölgeleri ve Klinik Özellikler

Periferik lenf nodları tipik olarak tutulur. Mediastinal tutulum (%15) ve kitlesel hastalık seyrek (10).

Çoğu hastaya evre I ve evre II hastalık sırasında tanı konur. Multipl relapsların daha az sıklıkla oluşması dışında klinik özellikler NLPHL'e benzer (10).

2.2.11.3.4. Histopatolojik ve İmmünofenotipik Özellikler

İki büyüme paterni vardır:

- Nodüler büyüme paterni (sık görülür)
- Diffüz büyüme paterni (nadir görülür).

Nodüler varyantın nodülleri ilgili dokunun büyük kısmını kaplamaktadır, böylece nodüller arası T zonu azalmıştır veya yoktur. Nodüller küçük lenfositlerden oluşmuştur ve germinal merkezler barındırabilir, bu germinal merkezler genellikle eksantrik lokalize olmuştur ve nispeten küçüktür veya regresedir. HRS hücreleri genellikle genişlemiş mantle tabakasında bulunur. HRS hücrelerinin bir kısmı

mononükleer laküner hücrelere veya NLPHL'daki popkorn hücrelerine benzeyebilir. Bu alt tip NLPHL ile kolaylıkla karıştırılabilir. Yakın zamanda, daha önce NLPHL olarak tanı konulan vakaların yaklaşık %30'unun LZKHL olduğu bulundu. Klasik HRS hücreleri için tipik olan immünofenotipin gösterilmesi bu ayrımın yapılmasında gereklidir. Zeminde eozinofiller ve/veya nötrofiller genellikle yoktur, fakat az sayıda bulunabilir. Diffüz vakalarda hücresel zeminde küçük lenfositler, epiteloid özellikleri olan veya olmayan çok sayıdaki histiositle karışık olabilir (10).

Hodgkin-Reed Sternberg hücreleri KHL'nin diğer formlarındakinin aynı fenotipini gösterir. Nodüllerde var olan küçük lenfositler mantle hücre özellikleri gösterir. (IgM+ ve IgD+). Böylece nodüller baskın olarak genişlemiş mantle zonu gösterir. En azından bazı nodüllerde CD21 pozitifliği gösteren folliküler dendritik hücreleri belirgin olup, ekzantrik yerleşimli genellikle küçük germinal merkezler içerir. Sağlam germinal merkezler NLPHL'de nadir olduğu için bu özellik ayırıcı tanıda yardımcıdır. Diffüz alt tipte lenfositler neredeyse tümüyle T hücre tipindedir (10).

2.2.11.3.5. Prognostik Özellikler

Modern tedavi yöntemleri ile yaşam süresi ve hastalıksız yaşam süresi diğer altgruplardan hafifçe daha iyidir ve NLPHL'ninkine benzer. Relaps yapan LZKHL'li hastalar, relaps yapan NLPHL'e göre daha kötü prognoza sahiptir (1).

2.2.11.4. LENFOSİTTEN FAKİR KLASİK HODGKİN LENFOMA

2.2.11.4.1. Tanımlama

Lenfositten fakir Hodgkin lenfoma, KHL'nin diffüz bir formudur, HRS hücrelerinden zengin ve/veya non-neoplastik lenfositlerden fakirdir. LFKHL, tanımı geçmiş birkaç on yılda değişikliklere uğramıştır, sonuçta bu alt tipte ilgili güvenilir klinik bilgi sınırlıdır.

Daha önceden LFKHL olarak tanı konmuş birçok vaka şimdi sıklıkla anaplastik veya pleomorfik büyük hücre morfolojili NonHodgkin lenfoma olarak tanı konmaktadır (10).

2.2.11.4.2. Epidemiyoloji

Bu alt tip KHL'nin en nadir alt tipidir, vakaların %5'den daha azını oluşturur. Günümüzde tanımlandığı gibi ortalama yaş KHL'nin diğer alt tiplerine benzer.

Ortalama yaş 37 yıldır ve %75'i erkektir. Bu alt tip sıklıkla HIV enfeksiyonu ile ilişkilidir ve gelişmekte olan ülkelerde daha sıklıkla görülür (10).

2.2.11.4.3. Tutulum Bölgeleri ve Klinik Özellikler

Sıklıkla abdominal organlar, retroperitoneal lenf nodları ve kemik iliği seçici olarak tutulmuştur, periferik lenf nodları da nispeten kapsanmıştır (10).

Lenfositler fakir klasik Hodgkin lenfoma sıklıkla ileri evre (yaklaşık %70) ve B semptomları (yaklaşık %80) ile ilişkilidir (10).

2.2.11.4.4. Histopatolojik ve İmmünofenotipik Özellikler

Lenfositler fakir klasik Hodgkin lenfomanın görünümü çok değişken olmasına rağmen önemli bir özelliği, HRS hücrelerinin zemindeki lenfositlere göre nisbi baskınlığıdır. Prototipik HRS hücrelerinin olduğu patern mikst hücreli alt tipe benzeyebilir, ancak daha fazla sayıda HRS hücreleri içermektedir. Bazı vakalarda pleomorfik hücreler baskın olabilir, sarkomatöz görünüm gösterebilir. Bu vakaların büyük hücreli NonHodgkin lenfomanın anaplastik tiplerinden ayırmak zor olabilir. Diğer bir patern, fibroblastların proliferasyonu olsun veya olmasın diffüz fibrozis ve sadece birkaç HRS hücreleri ile karakterizedir. Eğer nodüller sklerozan fibrozis görünümü varsa NSKHL tanısı konmalıdır (10).

HRS hücreleri KHL'nin diğer tipleri ile aynı immünofenotipi gösterir. Birçok HIV (+) vakalar EBV enfektedir ve LMP-1 ile pozitif olarak boyanır (10).

2.2.11.4.5. Prognostik Özellikler

Modern tedavi öncesinde LFKHL'nin klinik seyri agresif idi. Modern tedavi protokolleri sayesinde aynı evredeki KHL'nin diğer alt tiplerine benzer klinik seyir göstermektedir. Agresif gidiş HIV pozitif hastalarda hala nispeten sıktır (10).

2.3. NODÜLER LENFOSİT PREDOMİNANT HODGKİN LENFOMA

2.3.1. Tanım

Nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfoma, nodüler veya diffüz gelişim paterni içerisinde popkorn veya LP hücreleri olarak bilinen dağınık büyük neoplastik hücrelerin proliferasyonu ile karakterize monoklonal bir B hücre neoplazmidir. Bu LP hücreleri, nonneoplastik küçük lenfositlerden oluşan ve folliküler dendritik hücre ağına sahip büyük nodüller içinde bulunmaktadır. Halen saf diffüz tipte LPHL formunun var olup olmadığı belli değildir. Geçmişte diffüz LPHL tanısı almış çoğu lezyon muhtemelen lenfositten zengin klasik HL veya daha sıklıkla T hücrelerinden zengin büyük B hücreli lenfoma idi. Şimdilerde NLPHL ve T hücrelerinden zengin büyük B hücreli lenfoma arasında örtüşme dışlanamaz (10).

DSÖ'nün 2001 sınıflamasında Nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfomadaki neoplastik hücrelere LH hücreleri (Lenfosit ve/veya histiosit) adı verilmişti. Ancak 2008 DSÖ'de bu hücrelere popkorn yada LP hücreleri şeklinde tanımlama getirilmiştir (10).

2.3.2. Epidemiyoloji

Nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfoma tüm Hodgkin lenfomaların yaklaşık %5'ini gösterir. Hastaların çoğu erkektir ve 30-50 yaş grubunda sık görülür (10).

2.3.3. Tutulum Bölgeleri ve Klinik Özellikler

Nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfoma genellikle servikal, aksiller veya inguinal lenf nodlarını tutar. Mediastinal, dalak ve kemik iliği tutulumu nadirdir (10).

Çoğu hastanın tanı öncesi lokalize periferik lenfadenopatisi vardır ve düşük evrelidirler (Evre I veya II). Hastaların %5-20'sinin ileri evre hastalığı vardır. Hastalık yavaş ilerler, oldukça sık relaps yapar ve genellikle tedaviye duyarlı kalır ve böylece nadiren ölümcüldür (10).

2.3.4. Prekürsör Lezyonlar

Bazı hastalarda progresif transforme germinal merkezlerin (PTGM), NLPHL ile aynı anda ve aynı lenf nodunda veya önceki lenf nodunda, ardışık lenf nodu biyopsilerinde görüldüğü bildirilmiştir. PTGM'de irileşmiş reaktif lenfoid folliküllerin yanı sıra, bazı lenfoid folliküllerde mantle tabakasındaki küçük B

lenfositlerin germinal merkeze ilerlemesi ve burayı doldurması ile karakterize morfolojik görünüm vardır. PTGM'ler sıklıkla NLPHL ile ilişkili görüldüğü için bu lezyonların gerçek preneoplastik lezyonlar olup olmadığı kesin değildir. Ancak reaktif hiperplazili ve PTGM'li birçok hasta KHL'ye ilerlemez (10).

2.3.5. Histopatoloji

Lenf nodu yapısının tamamı yada bir kısmı bozulmuştur. Küçük lenfositler, histiositler, epiteloid histiositler ile karışık LP hücrelerinden oluşan nodüler veya diffüz infiltrat ile yer değiştirmiştir. LP hücreleri büyüktür ve genellikle bir büyük lobüle nükleus ve az sitoplazmaya sahiptir. Nükleus sıklıkla katlantılı veya multilobüledir, bundan dolayı "popkorn hücreler" olarak da adlandırılır. Kromatin genellikle vezikülerdir ve ince bir nükleer membranı vardır. Nükleol genellikle klasik HRS hücrelerinde görülenden daha küçük, bazofilik ve multipldir. Buna rağmen bazı LP hücreleri belirgin nükleol içerebilir veya birden fazla nükleusu vardır. Böylece klasik HRS hücrelerine benzeyebilir. Histiositler ve bazı poliklonal plazma hücreleri nodüllerin sınırında bulunabilir. Diffüz alanlar başlıca küçük lenfositler ile karışık tek veya gruplar halinde histiositlerden oluşmuştur. Değişen sayıda LP hücreleri de bulunabilir. Bu durum nadiren baskın olarak diffüzdür.

Şimdiki kriterlere göre NLPHL'nin tipik özelliklerini gösteren bir nodülün bulunması, primer T hücrelerinden zengin büyük B hücreli lenfoma tanısını dışlamada yeterlidir. Hem nodüler, hem diffüz bölgelerde nötrofiller ve eozinofiller yoktur. Bazen lezyona bitişik, germinal merkezleri progresif transformasyonlu reaktif folliküller hiperplazi vardır (10).

2.3.6. İmmünofenotipik Özellikler

LP hücreleri CD20, CD79a, BCL-6, CD45, CD75 ile neredeyse tüm vakalarda pozitif olup, J zinciri çoğu vakada ve EMA (epitelyal membran antijen) ile vakaların yaklaşık %50'sinde pozitifdir. İmmünglobulin hafif zincir ve/veya ağır zincirleri ile etiketlenme sıklıkla güçlü pozitifdir. LP hücreleri neredeyse tüm vakalarda CD15 ve CD30'dan yoksundur. Buna rağmen CD30 pozitifliği bazen görülebilir. Bu çoğu vakada LP hücreleri ile ilişkisiz reaktif CD30 pozitif lenfoid blastların varlığına bağlıdır. Nadiren LP hücreleri CD30'un zayıf ekspresyonunu gösterir. KI-67 nükleer pozitifliğinin ortaya koyduğu gibi birçok LP siklustadır. LP

hücrelerinin çoğu CD3 pozitif T hücreleri ve belli bir dereceye kadar CD 57 pozitif T hücreleri tarafından çevrenmiştir (10).

Oct-2 için immünpozitiflik seçici olarak LP hücrelerini vurgular ve bu hücrelerin tanımlanmasında faydalı bir araç haline gelebilir. Oct-2, koaktivatörü BOB-1 ile immünglobulin genlerinin promotörünün aktivasyonu yoluyla immünglobulin sentezini indükleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Oct-2 ve BOB-1 NLPHL ve KHL arasındaki ayırıcı tanıda da faydalıdır. Çünkü her iki molekül de LP hücrelerinde devamlı bulunurken, KHL'nin HRS hücrelerinde genellikle yoktur. Klasik HL vakalarında hem Oct-2 hem de BOB-1'i ekspres eden tümör hücreleri şimdiye kadar gözlenmemiştir (10).

Nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfomanın zemin yapısında, baskın olarak B hücreleri ve çok sayıda CD57 pozitif T hücrelerinden oluşmuş, folliküler dentritik hücre ağına sahip büyük nodüler yapılar görülür. CD10 pozitifliği gösteren germinal merkez hücreleri etkilenmiş alanlarda genellikle yoktur. CD20 gibi B hücre antijeni ile immünboyama nodülleri ortaya koymada faydalıdır. T hücreleri diffüz alanlarda çoktur ve zamanla nodüllerde bile çoğalma eğilimindedir (10).

2.3.7. Genetik

LP hücreleri monoklonal yeniden düzenlenmiş immünglobulin genlerine sahiptir. Monoklonal yeniden düzenlenmeler genellikle tüm doku DNA'sında bulunmayabilir, fakat sadece izole tek LP hücrelerinin DNA'sında saptanabilir. Ig ağır zincir genlerinin değişken bölgesi aşırı somatik mutasyonlar taşır ve ayrıca devam eden mutasyon bulguları gösterir. Yeniden düzenlenmeler genellikle fonksiyonaldır ve Ig mRNA transkriptleri birçok vakada LP hücrelerinde saptanabilir. Latent EBV enfeksiyonu LP hücrelerinde yoktur, ancak zemindeki tümöral olmayan lenfositlerde bulunabilir (10).

2.3.8. Varsayılan hücre orijini

Nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfoma için önerilen hücre orijini differansiyasyonun sentroblastik evresindeki germinal merkez B hücreleridir (10).

2.3.9. Prognoz ve Prediktif faktörler

Evre I ve evre II hastalıklı hastaların prognozu çok iyidir; %80'den fazla hastada yaşam süresi 10 yıldan fazladır. Bu iyi prognozu sağlayabilmek için hastalarda tedaviye ihtiyaç olup olmadığı net değildir. Bu nedenle örneğin Fransa

gibi bazı ülkelerde evre I hastalıkta, etkilenmiş lenf nodlarının rezeksiyonundan sonra medikal tedavi verilmemektedir. İleri evre hastalıkların kötü prognozu vardır. Büyük B hücreli lenfomaya ilerleme vakaların yaklaşık %3-5'inde bildirilmiştir. Büyük B hücreli lenfomalar ile ilişkili NLPHL, eğer lokalize ise genellikle iyi bir prognoza sahiptir. NLPHL ile ilişkili diffüz büyük B hücreli lenfoma arasında klonal bir ilişki gösterilmiştir (10).

2.4. COX-2

2.4.1. COX-2 ve Karsinogenez

Siklooksijenaz (Cox) inflamatuvar olaylarda önemli bir rol oynayan hız kısıtlayıcı enzimdir. Araşidonik asidin prostaglandin ve tromboksanlara dönüşümünü katalize eder. Cox'un iki izoformu tanımlanmıştır. Cox-1'in dokuların çoğunda ekspresyonundan dolayı homeostasisin sürdürülmesinde rol oynayan yapısal bir enzim olduğu düşünülmektedir. Aksine Cox-2 genellikle saptanmaz ve yapımı bakteriyel endotoksin, sitokin, büyüme faktörleri ve tümör öncülleri tarafından indüklenir (5).

Literatürde Cox-2'nin karsinogenez ve tümör progresyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Cox-2 mRNA'nın ve proteinin, bitişik normal kolon mukozası ile karşılaştırıldığında kolorektal adenokarsinom ve adenomda arttığı yayınlanmıştır (14). Cox aktivitesini inhibe eden NSAİİ'lerin adenomatöz polipozisli farede adenokarsinom sayısını azalttığı gösterilmiştir (15). Epidemiyolojik çalışmalar NSAİİ alan bir grup katılımcıda kolorektal adenokarsinom riskinin azaldığını gösterdi (5). Literatürde epitelyal tümörlerde Cox-2 ekspresyonunu araştıran çalışmalar genelde mide, meme, akciğer tümörlerinde yoğunlaşmaktadır (16, 17, 18). Cox-2'nin PG E2 yoluyla hücre proliferasyonunu, hücre adezyonunu, apoptoz inhibisyonunu, immün sürvelansı, anjiogenezi regüle ettiği düşünülmektedir (5).

2.4.2. Lenfomalarda COX-2 Ekspresyonu

Lenfomalarda Cox-2'yi araştıran makaleler genellikle NonHodgkin lenfoma olgularında yapılmış olup bu çalışmalarda normal lenfositlere göre Cox-2 ekspresyonunda artış olduğu, ayrıca Cox-2 pozitifliği gösteren olguların agresif seyir

gösterdiği, yüksek evreli olma gibi klinik parametrelerle ilişkili olduğu tesbit edilmiştir (19, 20). Cox-2 ekspresyonunun NonHodgkin lenfomada tedaviye yanıtta negatif bir prognostik faktör olduğu, yüksek rekürrens ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu yayınlanmıştır (21). Literatürde şu ana kadar Hodgkin lenfomada yapılmış sadece üç makale bulunabilmiştir (5, 19, 22). Bu çalışmaların biri 10 KHL olgusu içermiş ve bunların %70'inde Cox-2 pozitifliği saptanmıştır; 42 NHL olgusunda Cox-2 ekspresyonu ile prognostik parametreler arasında korelasyon tespit edilmiştir (19). Diğer çalışmada HRS hücrelerinde Cox-2 ekspresyonu ile hücre proliferasyonu ve angiogenez arasındaki ilişkisi araştırılmıştır (5). Ayrıca HRS hücrelerinde Cox ürünlerinden özellikle PG E2'nin KHL hastalarında hücre immünite düzenlenmesinde rol oynayabileceği yayınlanmıştır (22). Buna rağmen KHL'de Cox-2'nin rolü halen bilinmemektedir.

2.4.3. COX-2 ile EBV ve BCL-2 İlişkileri

İnsan monositlerinde yapılmış bir çalışmada çoğu EBV'nin, infeksiyon için Cox-2 veya PG E2'ye ihtiyaç duyduğu, fakat EBV ile infekte monositlerde PG E2 sekresyonu ve Cox-2 mRNA ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (23). Böylece EBV ile Cox-2 indüklenmesinin genel olarak kullanılamayacağı veya hücre tipine bağlı olabileceği bildirilmiştir (24).

Cox-2'nin kanser hücrelerinde Bcl-2 ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir. Ekzojen PG E2'nin prostat karsinom hücrelerini apoptozdan korumak için Bcl-2 ekspresyonunu indüklediği, bu etkinin Cox inhibitörleri tarafından tersine çevrildiği yayınlanmıştır (25). Fareye implante hepatom modelinde, Cox-2 selektif inhibitörü olan nimesulid, Bcl-2 ekspresyonunu azaltırken Bax ekspresyonunu arttırdığı belirtilmiştir (26). Bir hepatosellüler karsinom modelinde, Cox inhibitörlerinin apoptozu, Bcl-2 ve Cox-2'den bağımsız olarak düzenlediği bildirilmiştir (27). Kolon kanser hücrelerinde Cox-2 ile Bcl-2 ilişkisini araştıran bir çalışmada PG E2 sentezinin upregülasyonu yoluyla Bcl-2 mRNA ve proteinin artmış ekspresyonu ile Cox-2'nin tümör hücrelerinde apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir (28, 29).

2.5. BCL-2

2.5.1. Apoptozda BCL-2'nin Rolü

Apoptoz programlanmış hücre ölümüdür (2). Lenfoid dokunun gelişim ve differansiyasyonunda önemlidir (30). Lenfoid hücrelerin büyümesi, hücrenin yaşam şansı ve hücre ölümünü kontrol eden moleküller arasındaki hassas denge ile düzenlenir (31). Fizyolojik hücre ölümünün düzenlenmesinde bozukluk aberran hücre birikimine ve tümör büyümesine neden olur (30). Apoptoz farklı morfolojik değişiklikler ve nükleus içi DNA fragmentasyonu ile karakterizedir. Apoptozun morfolojik özellikleri iyi tanımlanmış olmasına rağmen apoptoz arkasındaki moleküler mekanizmalar hala açık değildir (30). Bcl-2 geni mitokondride yerleşmiş bir antiapoptotik membran ilişkili moleküldür. Bcl-2 proteini antiapoptotik fonksiyonlarını, mitokondriden sitokrom c salınımını ve kaspas 9 ve Bax (Bcl-2 ilişkili x proteini) ile apoptoz aktive edici faktör (Apaf-1) arası ilişkiyi düzenleyerek gösterir (32). Bcl-2 geni, onkogenik etkisini apoptozu inhibe ederek gösterir (11).

2.5.2. Lenfomalarda BCL-2 Ekspresyonu

Bcl-2'nin keşfi B hücreli folliküler lenfomaların yaklaşık %85'inde Bcl-2 geni 18q21 bölgesinin 14q32 üzerindeki immünglobulin ağır zincir lokusuna transloke olduğu karakteristik t(14;18)(q32;q31) translokasyonu taşıdığına gözlenmesiyle başlamıştır. Böylece bu translokasyon folliküler lenfoma vakalarında Bcl-2'nin aşırı ekspresyonuna neden olur (11).

Bcl-2 proteini matür lenfoid dokuda topografik dağılım gösterir ve esasen germinal merkezde yoktur. Zararlı veya arızalı mutasyona sahip germinal merkez B hücreleri genellikle apoptoz ile hızlıca elimine edilirler. Germinal merkez B hücrelerinde apoptozu neden olan zararlı mutasyonların sadece bir bölümü arızalı mutasyonlar olarak tanınıp elimine edilirse, bu durumda HRS hücrelerinin transforme edici bir olay tarafından kurtularak preapoptotik germinal merkez B hücrelerini temsil edebilir. Germinal merkez B hücrelerinde Bcl-2 down regülasyonunda başarısızlığın bu hücrelerde malign transformasyonu tetikleyebileceği söylenmiştir (33). Hodgkin lenfomayı da içeren bazı hematopoetik malignansilerin patogenezi araştırılan çalışmalarda HL'da Bcl-2 ekspresyonu bildirilmiştir (4, 6, 30, 31, 33, 34). Bir çalışmada Hodgkin lenfoma materyallerinde

immünohistokimyasal Bcl-2 ekspresyonunun apoptoz ile ters ilişkili olduğu gösterilmiştir (30).

2.5.3. BCL-2 ve EBV İlişkisi

Bazı EBV ilişkili malignansilerin Bcl-2 ailesi üyelerini eksprese ettiği söylenmektedir (30). İki EBV latent proteini, LMP-1 ve LMP-2a sırasıyla nazofarengeal karsinom ve EBV pozitif allograftların vasküler endoteliumunda Bcl-2 ekspresyonu ile korele idi (35, 36). Buna rağmen diğer çalışmalar nazofarengeal karsinom ve HeLa hücrelerinde LMP-1 ile Bcl-2 arasında ilişki olmadığını gösterdi (37). Bcl-2 ekspresyonu ile EBV özel proteinleri arasındaki direk ilişki hala anlaşılammıştır (24). EBV, BHRF1 ve BALF1'den oluşan iki Bcl-2 homologunu kodlanmasını düzenlediği bildirilmiştir. BALF-1, BHRF1'in antiapoptotik aktivitesini inhibe eder (38). Bcl-2 eksprese eden 39 nazofarengeal karsinom vakasından 38'inde olduğu gibi BFRF1'in, EBV pozitif hücrelerde eksprese edilen primer Bcl-2 homologu olduğu sanılmaktadır (39).

2.6. LMP-1

EBV ilişkili tümörlerde sınırlı sayıda gen eksprese edilir. Bunlar 6 nükleer antijen (EBNA-1, 2, 3-A, 3B, 3C ve -LP) ve 3 latent membran proteini (LMP-1, 2A, 2B)'dir. LMP-1 viral onkogen olarak düşünülmektedir, çünkü izolasyonda transformasyon yeteneği olan ve insan B hücrelerinde DNA sentezini indükleyen tek EBV kodlanmış proteindir (12).

2.6.1. Klasik Hodgkin Lenfomada LMP-1 Ekspresyonu

EBV ile HL arasındaki ilişki son yıllarda yoğun olarak araştırılmaktadır. Vakaların bir bölümünde neoplastik hücrelerde EBV genomlarının gösterilmesi hastalığın patogenezindeki rolünde önemli bulgular sağlamıştır (11, 4). EBV infeksiyöz mononükleozun nedenidir ve HL oluşumu ile koreledir (31). Ancak EBV ve HL arasındaki ilişki coğrafi lokalizasyona göre değişir (41). Gelişmiş ülkelerde EBV, KHL vakalarının %30-50'sinde ve gelişmekte olan ülkelerde vakaların %95'ine kadar bildirilmiştir (42). EBV ilişkili KHL dokularında HRS hücreleri yüksek seviyede LMP-1 eksprese eder. LMP-1 yapısal olarak aktive tümör nekroz faktör reseptörü olarak fonksiyon görür (4). LMP-1, EBV ile kodlanan genlerden

biridir, onkogen olarak etki yapar ve salınımı transgenik farede B hücreli lenfomaya neden olur. LMP-1, B hücre yüzey molekülü olan CD40 üzerinden B hücre aktivitesini taklit eden aktif sinyal yolu ile B lenfositlerin çoğalmasını uyarır. Aynı zamanda LMP-1'in, Bcl-2'yi aktive ederek apoptozu engellediğini bildiren yayınlar vardır (11). Cox-2'nin insan kanserlerinde potansiyel bir rolü olduğunu belirten in vitro yapılan bir çalışmada EBV pozitif hücrelerde Cox-2 seviyeleri Cox-2 negatif hücrelere göre daha yüksek bulunmuştur (42).

3- MATERYAL VE METOD

3.1. Olgular

Bu çalışmaya 1998-2009 yılları arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında tanı almış klasik Hodgkin lenfoma vakaları dahil edildi. Olgular, arşiv materyalinden taranarak belirlenmiş ve bunlara ait hematoksilin eozin (H-E) kesitler ile tanı sırasında kullanılan immünboyamalar ışık mikroskopik olarak tekrar değerlendirilerek DSÖ 2008 (10) sınıflamasına göre klasifiye edildi. Tüm vakalar %10'luk tamponlu formaldehitte fikse edilmiş parafin materyali idi. Çalışmaya CD30, CD15, CD45, CD3, CD20 belirleyicileri ile ispatlanmış KHL vakaları alındı ve bu özellikleri taşıyan 40 KHL olgusu elde edildi. Çalışmaya alınan bu olgular ilk tanısı KHL olan vakalardı. Aynı kişilere ait nüks dokular ile daha önceden tanı almış tedavi altında olup relaps gösteren KHL dokuları çalışmaya alınmadı. Tüm vakalarda immünfenotipik olarak HRS hücrelerinde CD30 ve/veya CD15 ekspresyonu vardı, CD45 ekspresyonu yoktu. CD20 ekspresyonu genellikle negatif olup bazı olguda seyrek HRS'de pozitif. CD3 ile HRS hücreleri etrafında rozet yapan küçük lenfositlerde pozitiflik izlendi. H-E kesitlerde HRS hücrelerinin en bol olduğu alanlar daha sonra yapılacak doku mikroarrayi incelemesi için işaretlendi.

Hastalara ait klinik bilgiler Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Hastanesi ile Onkoloji Merkezi arşivinde bulunan hasta dosyaları taranarak elde edildi. Hastalara ait klinik evreler, çalışmanın yapıldığı sırada yaşayıp yaşamadıkları ve çalışma bittiği ana kadarki sağkalım süreleri dosyalardan belirlendi. Arşiv dosyalarında sağkalımla ilgili bilgi içermeyenlere telefon edilerek ulaşılmaya çalışıldı. Elde edilen klinik verilere göre Ann Arbour evrelemesi uygulandı.

3.2. Doku mikroarray tekniği-DMA (Tissue mikroarray yöntemi)

Doku mikroarray tekniği kullanılarak tek bir preparatta multipl doku örneklerinin paralel analizini yapmak amacıyla önce her vakada H-E preparatlarda HRS hücrelerinin en yoğun izlendiği alanlar seçilerek işaretlendi. İşaretlenen preparatlar ile bloklar karşılaştırılarak işaretli alanları içerecek şekilde herbiri 2 mm boyutunda olan 3 ayrı kor doku arrayi kullanılarak (LABVİSİON Tissue Microarray Builder LOT 80428 Fremont CA 94539 USA) çıkartıldı ve yeni bloğa yerleştirildi.

Oluşturulan bu yeni bloklardan kesitler alınarak immünohistokimyasal boyama yapıldı.

3.3. İmmünohistokimyasal İnceleme ve Değerlendirme

DMA yöntemi kullanılarak hazırlanan parafine gömülü bloklardan immünohistokimyasal inceleme için lizinli lamlara 5 µm kalınlıkta kesitler alındı. Çalışmamızda Cox-2 (Rabbit PAb, Neomarkers, Fremont CA, Kat. No:RB-9072-P), Bcl-2 (Mouse Monoclonal, Clone 100/D5, Neomarkers, Kat. No:123-P1) ve LMP-1 (Mouse Monoclonal Coctail, Neomarkers, Kat. No:MS-1458-51, Fremont –CA USA) antikorları kullanılarak streptavidin biyotin peroksidaz yöntemi ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. İmmünohistokimyasal boyamalar Ventana Benchmark XT cihazı kullanılarak uygulandı. Bu işlemde aşağıdaki boyama prosedürü izlendi:

- Parafin kesitler 60 derecedeki etüvde 1 saat inkübe edildi.
- Ksilende iki kez 15'er dakika bekletildi.
- Absolü alkolden iki kez 10'ar dakika geçirilerek deparafinize edildi.
- Preparatlar distile su ile yıkandı.
- Antijen retrieval aşaması uygulandı. (PT modülle cihazında pH=6'da 98°'de 20 dakika ısıtıldı.
- Distile suda yıkandı.
- %3'lük H₂O₂ ile 10 dakika muamele edildi.
- Distile su ile 5 dakika yıkandı.
- Fosfatla tamponlanmış salin (PBS) solüsyonunda iki kez 5'er dakika yıkandı.
- Ultra V blok solüsyonu 5 dakika uygulandı.
- Primer antikorlar damlatıldı. COX-2 için 1/100 dilüsyon 30 dakika inkübasyon yapıldı. BCL-2 için 1/50 dilüsyon 60 dakika inkübasyon yapıldı. LMP-1 için 1/25 dilüsyon, 60 dakika inkübasyon yapıldı.
- PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkandı.
- Biotinylated goat anti-polyvalent (sarı link) ile 20 dakika inkübe edildi.
- PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkandı.
- Streptavidin peroxidase (pembe link) ile 20 dakika inkübe edildi.
- PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkandı.

- DAB kromojeni 5 dakika uygulandı.
- Kesitler distile su ile yıkandı.
- Mayer Hematoksileni ile 30 s süreyle zıt boya yapıldı.
- Çeşme suyunda yıkandı.
- Artan konsantrasyondaki alkollerden (70°, 80°, 90°) geçirilerek dehidrasyon yapıldı.
- Ksilenle yıkandı.
- Mounting medium kullanılarak lamel kapatıldı.

İmmünohistokimyasal boyamalar ışık mikroskopunda değerlendirildi. Cox-2 ve Bcl-2 için HRS hücrelerinde sitoplazmik boyanma olması immünopozitif olarak kabul edildi. Pozitif boyanan hücrelerin % oranı dikkate alınarak aşağıdaki şekilde skorlandı. Bcl-2 ve Cox-2 için %10 cutoff değerinin üzerindeki olgular pozitif olarak kabul edildi. Buna göre *negatif (0)*: boyanma olmayan ve <%10 hücrede pozitiflik; *düşük (minimal) ekspresyon (+1)*: %10-49 hücrede boyanma; *yüksek (diffüz) ekspresyon (+2)*: ≥%50 hücrede boyanma olarak skorlandı (Resim 1, 2, 3, 4).

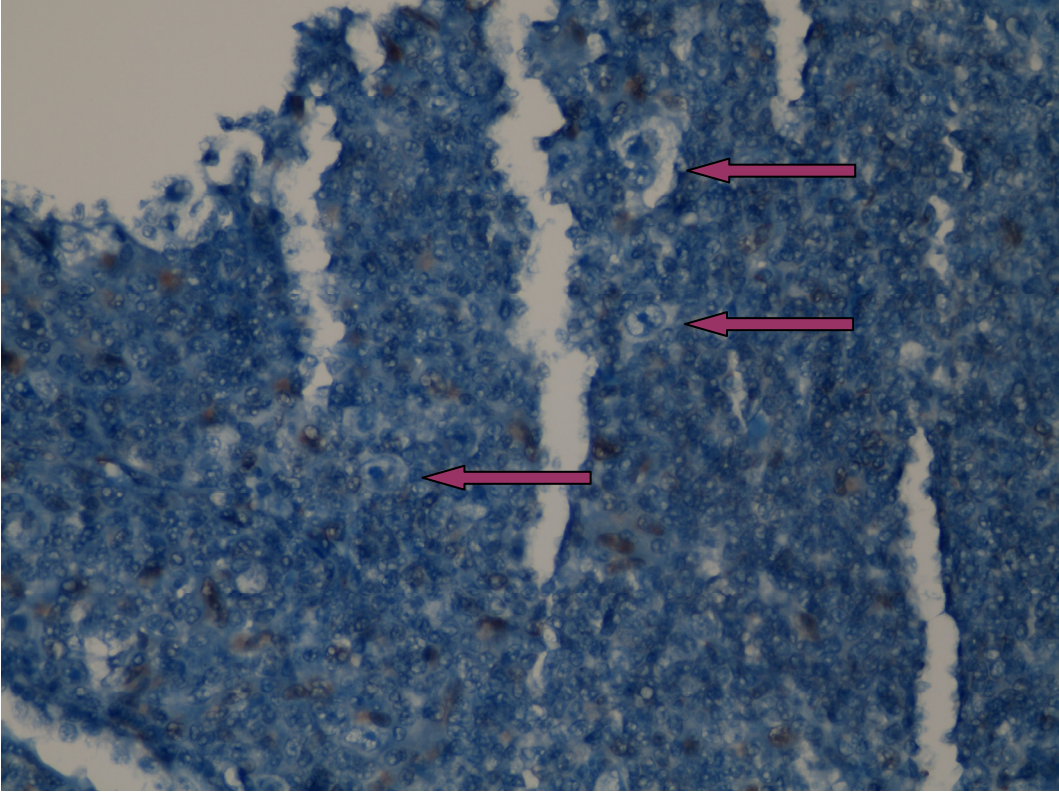
HRS hücrelerinde LMP-1'in sitoplazmik, membranöz ve golgi zon boyanması immünopozitif olarak kabul edilerek olgular LMP-1 pozitif ve negatif olarak değerlendirildi (Resim 5, 6).

3.4. Sağkalım Değerlendirmesi

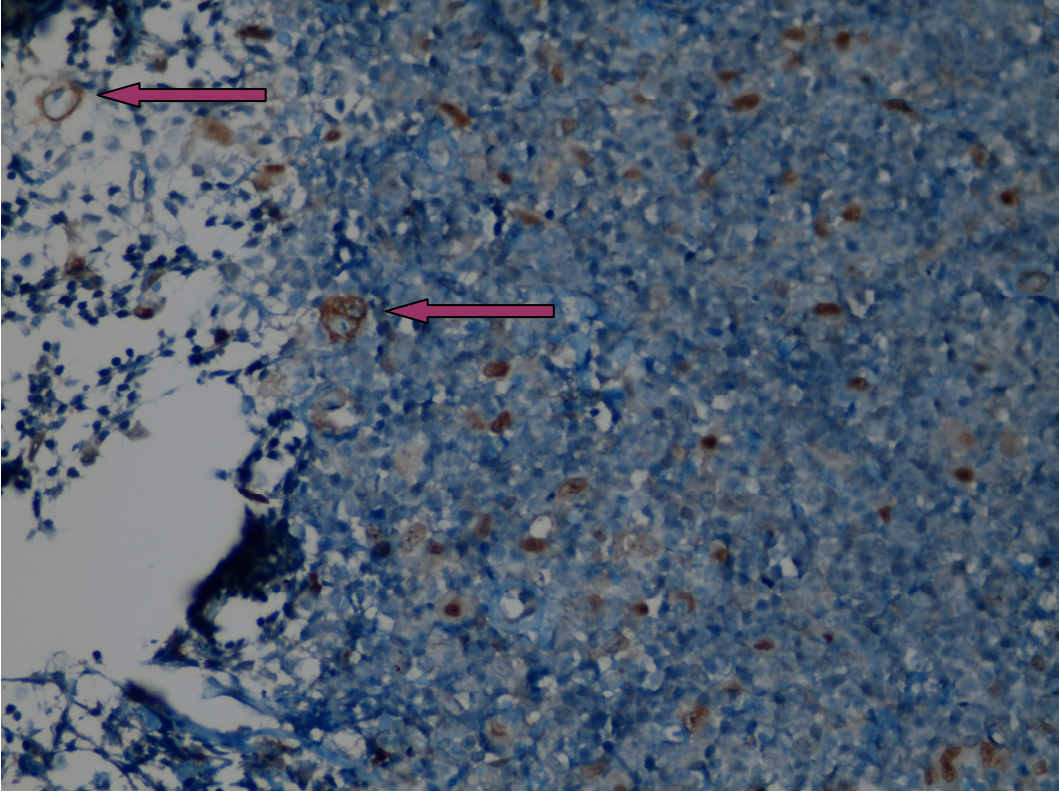
Hastaların yaşam süresi ilk tanı anından çalışma bitinceye kadar olan süre olarak hesaplanarak ay olarak verildi. Hastaların yaşam durumları ile ilgili bilgi içermeyenler de telefonla aranarak sağkalım sorgulandı. Eksitus olan hastalar için tanı anından ölüm tarihine kadar geçen süre sağkalım süresi olarak belirlenerek ay olarak hesaplandı.

3.5. İstatistiksel Analiz

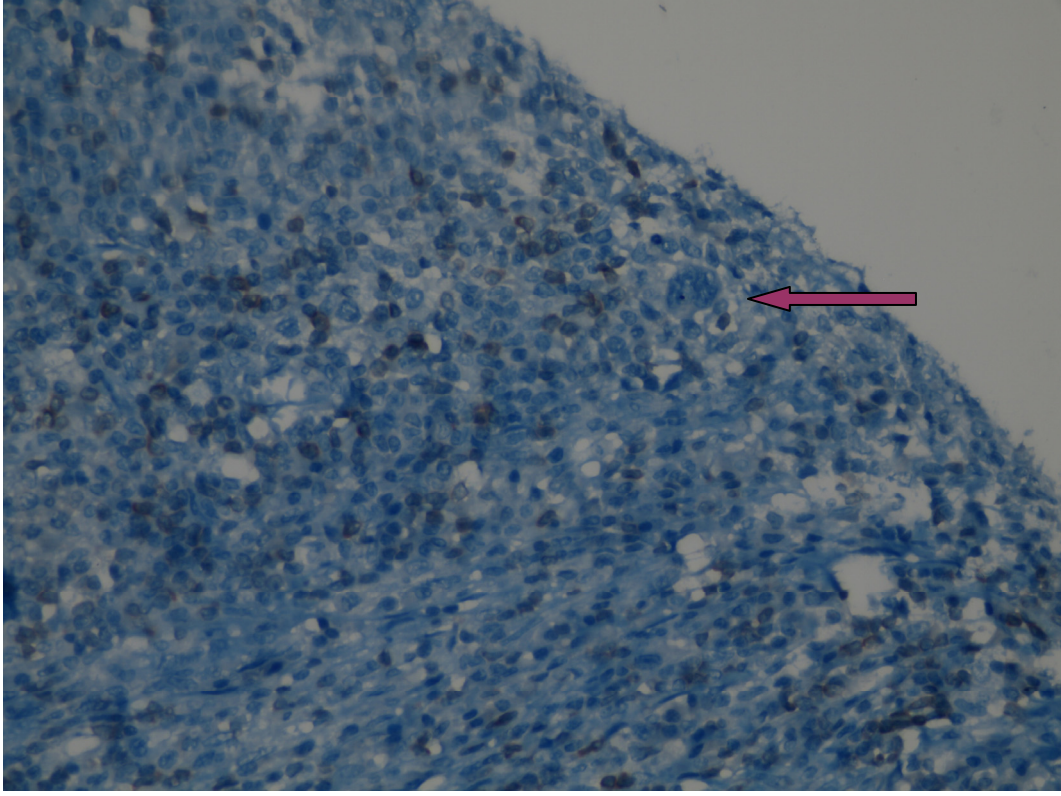
İstatistiksel analizde SPSS 15 Version kullanıldı. Cox-2, Bcl-2 ve LMP-1 verileri ile klinikopatolojik parametrelerle arasındaki ilişki Pearson ki-kare testi, Spearman korelasyon testi ile analiz edildi. Mann-Whitney U testi ile histolojik tipler arasındaki Cox-2 ve Bcl-2 ekspresyonu değerlendirildi. Sağkalım analizi için Kaplan-Meier log rank testi, çok değişkenli sağkalım analizi için Cox regresyon testi uygulandı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



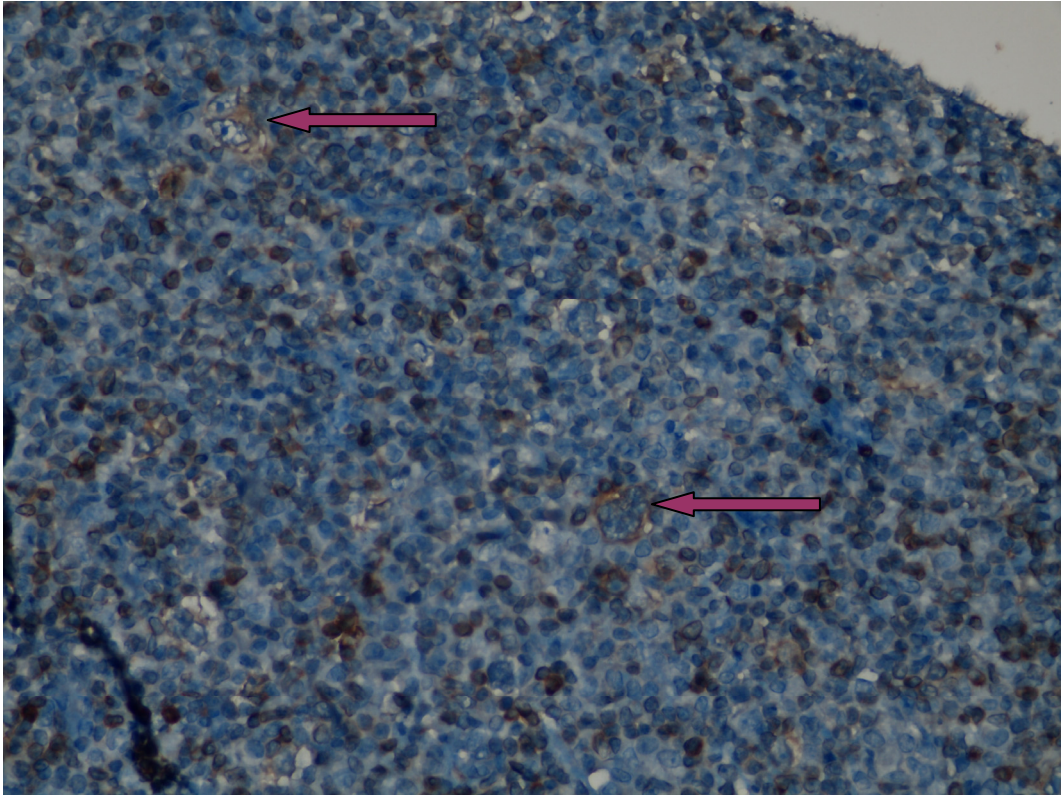
Resim 1: HRS hücrelerinde (oklar) Cox-2 negatifliği (HE x 400)



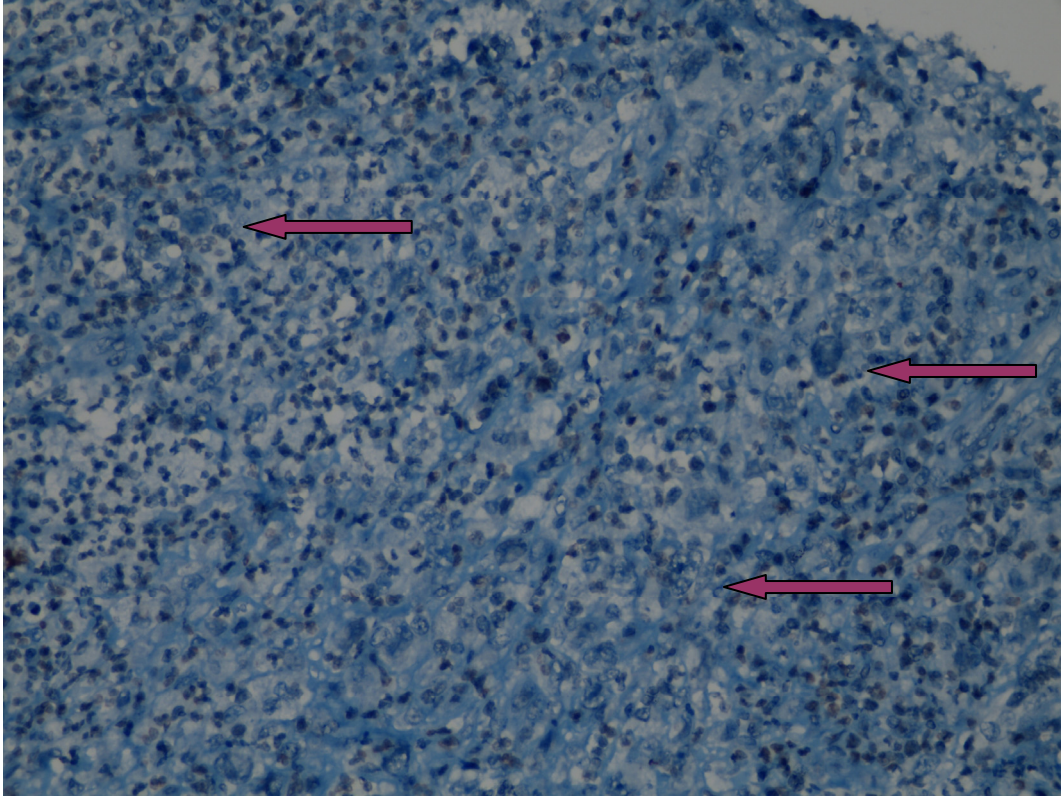
Resim 2: HRS hücrelerinde (oklar) Cox-2 pozitifliği (HE x 400)



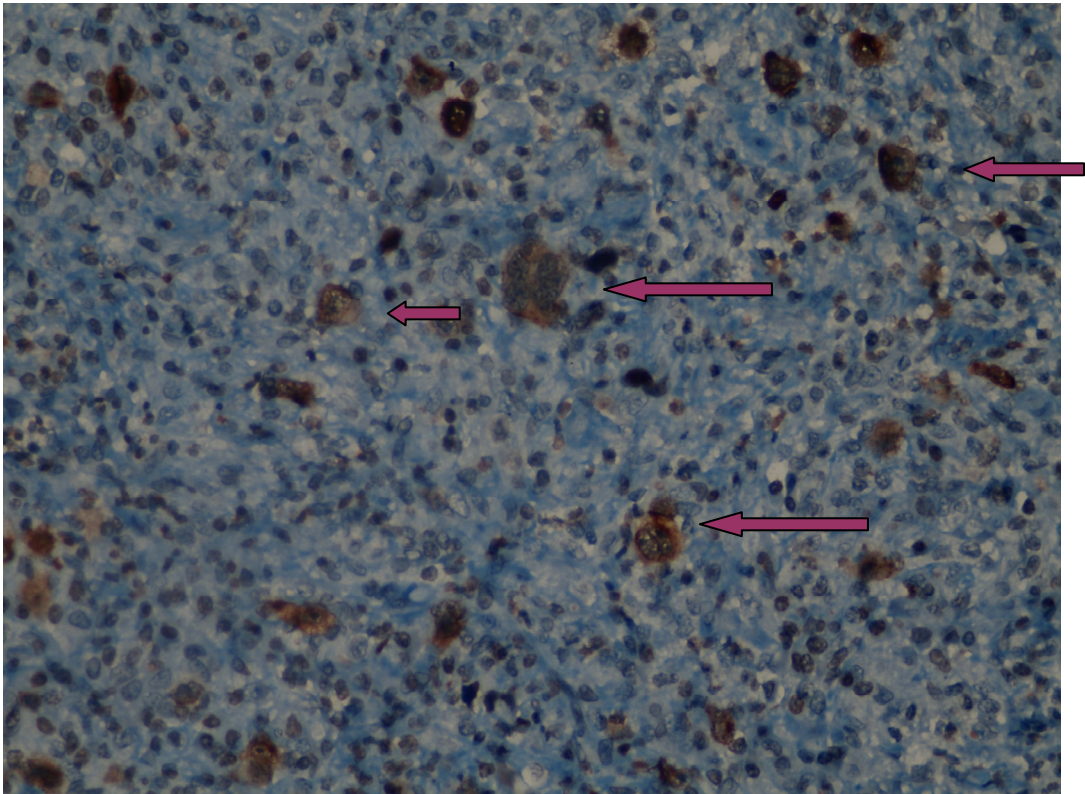
Resim 3: HRS hücresinde (ok) Bcl-2 negatifliği (HE x 400)



Resim 4: HRS hücrelerinde (oklar) Bcl-2 pozitifliği (HE x 400)



Resim 5: HRS hücrelerinde (oklar) LMP-1 negatifliği (HE x 400)



Resim 6: HRS hücrelerinde (oklar) yaygın LMP-1 pozitifliği (HE x 400)

4- BULGULAR

4.1. Klinik ve Morfolojik Bulgular

Çalışmamız 40 KHL olgusu içermiştir. Tablo 3’de bu olgulara ait klinik parametreler özetlenmiştir. Histolojik alt tipe göre olgular 29 (%72,5) MHKHL ve 11 (%27,5) NSKHL şeklinde dağılım gösterdi. Lenfositten zengin ve lenfositten fakir KHL tipleri yoktu.

Tüm olgularda genel yaş ortalaması $36,8 \pm 20,9$ idi. Yaş aralığı 3-89 arasında değişti. MHKHL’de yaş aralığı 3-89 (ortalama $41,9 \pm 22,0$), NSKHL’de 13-42 (ortalama $23,3 \pm 8,0$) idi. Onsekiz yaş altı olgular pediatrik yaş grubu olarak, 18 yaş üstü olgular da yetişkin yaş grubu olarak gruplandı. Buna göre tüm olgular içerisinde 8 (%20) olgu pediatrik, 32 (%80) olgu yetişkin yaş grubunda idi.

Tablo 3: KHL’de klinik parametrelere göre olguların dağılımı

	n=40 (%)
Cinsiyet	
E	27 (%67,5)
K	13 (%32,5)
Yaş	$36,8 \pm 20,9$ (3-89)
Yaş grupları	
<18	8 (%20)
≥18	32 (%80)
Histolojik Tip	
MHKHL	29 (%72,5)
NSKHL	11 (%27,5)
Evre	
I	1 (%2,6)
II	19 (%48,7)
III	15 (%38,5)
IV	4 (%10,3)

Çalışmadaki 40 KHL vakasının 39'unda evreleme yapılabildi. Ulaşılamayan bir olgu konsültasyon olgusu olup dosya bilgileri bulunmamaktaydı. Ann Arbour klinik evrelemeye göre 1 (%2,6) hasta evre I, 19 (%48,7) hasta evre II, 15 (%38,5) hasta evre III, 4 (%10,3) hasta evre IV idi (Tablo 3). Evre I ve evre II'li hastalar düşük evreli, evre III ve evre IV'lü hastalar yüksek evreli olarak sınıflandırıldı. Buna göre 20 (%51,3) hasta düşük evreli, 19 (%48,7) hasta yüksek evreli idi. Tedavi protokollerine ulaşılabilen hastalarda ABVD (Adriamisin, Bleomisin, Vinblastin ve Dakarbazin), OPPA (Adriamisin, Vinkristin, Prokarbazin, Prednizolon), OEPA (Adriamisin, Vinkristin, Prednizon, Etoposid) ve BEACHOOP'dan (Bleomisin, Etoposid, Adriamisin, Siklofosfamid, Vinkristin, Prednizolon) oluşan kemoterapi protokollerinden biri uygulanmıştı.

Çalışmamızdaki 40 KHL'nin 27'si (%67,5) erkek, 13'ü (%32,5) kadın idi. MHKHL'li 29 hastadan 25'i (%86,2) erkek, 4'ü (%13,8) kadın idi, 11 NSKHL'li hastadan 2'si (18,2) erkek, 9'u (81,8) kadın idi. Histolojik alt tipler arasında cinsiyet yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (Fisher's Exact Test $p<0.001$) (Tablo 4).

Tablo 4: Histolojik alt tiplerin cinsiyet ile ilişkisi

	Kadın n (%)	Erkek n (%)	Toplam n (%)	p
MHKHL	4 (%13,8)	25 (%86,2)	29 (%100)	p<0.001
NSKHL	9 (%81,8)	2 (%18,2)	11 (%100)	
Toplam	13 (%32,5)	27 (%67,5)	40 (%100)	

Histolojik alt tiplere göre yaş grubu dağılımı incelendiğinde, MHKHL'de 5 (%17,2) vaka pediatrik, 24 (%82,8) vaka yetişkin yaş grubunda olup, NSKHL'de 3 (%27,3) vaka pediatrik, 8 (%72,7) vaka yetişkin yaş grubunda idi. Histolojik alt tipler ile yaş grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (Fisher's Exact Test, $p>0,05$) (Tablo 5).

Tablo 5: Histolojik alt tip ile yaş grubu ilişkisi

	Pediatric yaş grubu	Yetişkin yaş grubu	Toplam	
	n (%)	n (%)	n (%)	
MHKHL	5 (%17,2)	24 (%82,8)	29 (%100)	p>0,05
NSKHL	3 (%27,3)	8 (%72,7)	11 (%100)	
Toplam	8 (%20)	32 (%80)	40 (%100)	

Histolojik alt tiplere göre evre incelendiğinde 29 MHKHL vakasından 28'inde Ann Arbour evreleme yapılabilir. Buna göre 1 (%3,6) hasta evre I, 10 (%35,7) hasta evre II, 13 (%46,4) hasta evre III, 4 (%14,3) hasta evre IV idi. Onbir (%39,3) hasta düşük evreli, 17 (%60,7) hasta yüksek evreli idi. NSKHL grubunda evre I ve evre IV hasta yoktu, 9 (%81,8) hasta düşük evreli, 2 (%18,2) hasta yüksek evreli idi. İki histolojik grup arasında dörtlü evrelemeye yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (Pearson χ^2 , p=0,07) (Tablo 6). Ancak evre düşük ve yüksek olarak iki gruba ayrıldığında MHKHL'de yüksek evreli olma oranı NSKHL'ye göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (Fisher's Exact Test, p=0,031). Yirmisekiz MHKHL vakasından 17'si (%60,7) yüksek evreli, 11 NSKHL vakasından 9'u (%81,8) düşük evreli idi (Tablo 7).

Tablo 6: Histolojik alt tiplerin evre ile ilişkisi

	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV	Toplam	p
	n (%)	n (%)	n (%)	N (%)	n (%)	
MHKHL	1 (%3,6)	10 (%35,7)	13 (%46,4)	4 (%14,3)	28 (%100)	p=0,07
NSKHL	0 (%0)	9 (%81,8)	2 (%18,2)	0 (%0)	11 (%100)	
Toplam	1 (%2,6)	19 (%48,7)	15 (%38,5)	4 (%10,3)	39 (%100)	

Tablo 7: Düşük ve yüksek evre ile histolojik alt tip ilişkisi

	Düşük evre	Yüksek evre	Toplam	p
	(Evre I+II)	(Evre III+IV)	n (%)	
	n (%)	n (%)		
MHKHL	11 (%39,3)	17 (%60,7)	28 (%100)	p=0,031
NSKHL	9 (%81,8)	2 (%18,2)	11 (%100)	
Toplam	20 (%51,3)	19 (%48,7)	39 (%100)	

Cinsiyet ile yaş grubu dağılımı incelendiğinde, KHL vakalarındaki 13 kadın hastadan 4'ü (%30,8) pediatrik, 9'u (%69,2) yetişkin yaş grubunda idi, 27 erkek hastadan 4'ü (%14,8) pediatrik, 23'ü (%85,2) yetişkin yaş grubunda idi. Cinsiyet ile yaş grupları arasında anlamlı farklılık yoktu (Fisher's Exact Test $p>0.05$) (Tablo 8).

MHKHL'de 4 kadın hastadan 1'i (%25) pediatrik, 3'ü (%75) yetişkin yaş grubunda idi, 25 erkek hastadan 4'ü (%16) pediatrik, 21'i (%84) yetişkin yaş grubunda idi. NSKHL grubunda 9 kadın hastadan 3'ü (%33,3) pediatrik, 6'sı (%66,7) yetişkin yaş grubunda idi, 2 (%100) erkek hastanın tümü yetişkin yaş grubunda idi. MHKHL ve NSKHL gruplarında cinsiyet ile yaş grubu arasında anlamlı ilişki yoktu (Fisher's Exact Test $p>0.05$).

Tablo 8: KHL'de cinsiyet ile yaş grubu ilişkisi

	Pediatrik yaş grubu N (%)	Yetişkin yaş grubu n (%)	Toplam n (%)	p
Kadın	4 (%30,8)	9 (%69,2)	13 (%100)	p>0.05
Erkek	4 (%14,8)	23 (%85,2)	27 (%100)	
Toplam	8 (%20)	32 (%80)	40 (%100)	

Cinsiyet ile evre dağılımı incelendiğinde, KHL'da 13 kadın hastadan 9 (%69,2) hasta evre II, 4 (%30,8) hasta evre III idi, 26 erkek hastadan sırasıyla 1 (%3,8), 10 (%38,5), 11 (%42,3) ve 4'ü (%15,4) evre I, II, III ve IV idi. İkili evrelemeye göre 13 kadın hastadan 9'u %69,2 düşük evreli, 4'ü %30,8 yüksek evreli, 26 erkek hastadan 11'i (%42,3) düşük evreli, 15'i (%57,7) yüksek evreli idi. Cinsiyet ile düşük ve yüksek evre yada dördü evre arasında anlamlı ilişki yoktu (Fisher's Exact Test $p>0.05$, Pearson χ^2 , $p>0.05$) (Tablo 9).

MHKHL'de 4 kadın hastadan 2'si (%50) evre II, 2'si (%50) evre III idi, 24 erkek hastada sırasıyla 1 (%4,2), 8 (%33,3), 11 (%45,8) ve 4 (%16,7) hasta evre I, II, III ve IV idi. 4 kadın hastadan 2'si (%50) düşük evreli, 2'si (%50) yüksek evreli, 24 erkek hastadan 9'u (%37,5) düşük evreli, 15'i (%62,5) yüksek evreli idi. NSKHL grubunda ise 9 kadın hastadan 7'si (%77,8) evre II, 2'si (%22,2) evre III idi. 2 erkek hastanın tümü (%100) düşük evreli idi. MHKHL'de ve NSKHL'de cinsiyet ile evre arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Fisher's Exact Test $p>0.05$).

Tablo 9: KHL’de cinsiyet ile düşük ve yüksek evre ilişkisi

	Düşük evre (Evre I+II) n (%)	Yüksek evre (Evre III+IV) n (%)	Toplam n (%)	P
Kadın	9 (%69,2)	4 (%30,8)	13 (%100)	p>0.05
Erkek	11 (%42,3)	15 (%57,7)	26 (%100)	
Toplam	20 (%51,3)	19 (%48,7)	39 (%100)	

Yaş grubu ile evre ilişkisi incelendiğinde, KHL’de pediatrik yaş grubunda evre I ve IV hasta yoktu, 5 (%62,5) hasta evre II, 3 (%37,5) hasta evre III idi. Yetişkin yaş grubunda sırasıyla 1 (%3,2), 14 (%45,2), 12 (%38,7), 4 (%12,9) hasta evre I, II, III ve IV idi. Pediatrik yaş grubunda yüksek evreli 3 (%37,5) hasta, düşük evreli 5 (%62,5) hasta vardı. Yetişkin yaş grubunda yüksek evreli 16 (%51,6) hasta, düşük evreli 15 (%48,4) hasta vardı. Yaş grupları arasında dörtlü ya da ikili evreleme yönünden anlamlı farklılık saptanmadı (Sırasıyla, Pearson χ^2 , $p>0,05$, Fisher’s Exact Test $p>0,05$) (Tablo 10).

MHKHL’de pediatrik yaş grubunda evre I ve IV hasta yoktu, 3 (%60) hasta evre II, 2 (%40) hasta evre III idi. Yetişkin yaş grubunda 1 (%4,3) hasta evre I, 7 (%30,4) hasta evre II, 11 (%47,8) hasta evre III, 4 (%17,4) hasta evre IV idi. NSKHL’de pediatrik yaş grubunda evre I ve evre IV hasta yoktu, 2 (%66,7) hasta evre II, 1 (%33,3) hasta evre III idi. Yetişkin yaş grubunda da evre I ve IV hasta yoktu, 7 (%87,5) hasta evre II, 1 (%12,5) hasta evre III idi. MHKHL ve NSKHL gruplarında evre ile yaş grupları arasında anlamlı ilişki yoktu (Fisher’s Exact Test ($p>0,05$)).

Tablo 10: KHL’de düşük ve yüksek evrenin yaş grubu ile ilişkisi

	Düşük evre (Evre I+II) n (%)	Yüksek evre (Evre III+IV) n (%)	Toplam n (%)	p
Pediatrik yaş grubu	5 (%62,5)	3 (%37,5)	8 (%100)	p>0,05
Yetişkin yaş grubu	15 (%48,4)	16 (%51,6)	31 (%100)	
Toplam	20 (%51,3)	19 (%48,7)	39 (%100)	

Tablo 11’de özetlendiği gibi KHL olgularında histolojik alt tipler arasında cinsiyet ve evre yönünden anlamlı farklılık olduğu saptandı.

Tablo 11: KHL’deki histolojik alt tipler ile klinik parametreler arasındaki ilişki

	KHL n=40	MHKHL n=29 (%)	NSKHL n=11 (%)	p
Cinsiyet				
Erkek	27	25 (%92,5)	2 (%7,4)	p<0.001
Kadın	13	4 (%30,7)	9 (%69,2)	
Yaş				
<18	8	5 (%62,5)	3 (%37,5)	p>0,05
≥18	32	24 (%75)	8 (%25)	
Evre				
Düşük evre	20	11 (%55)	9 (%45)	p=0,031
Yüksek evre	19	17 (%89,4)	2 (%10,5)	

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.2.1. COX-2 ekspresyonu

Kırk olgunun 20'sinde (%50) sitoplazmik Cox-2 ekspresyonu saptandı. Skorlamaya göre olgular 20 (%50) olgu negatif (0), 8 (%20) olgu +1 ve 12 (%30) olgu +2 olarak dağılım gösterdi.

Cox-2 ekspresyonu histolojik alt tiplere göre incelendiğinde; 29 MHKHL'de 11 (%37,9) vakada Cox-2 pozitif, 18 (%62,1) vakada negatif; 11 NSKHL'nin 9'unda (%81,8) Cox-2 pozitif, 2 (%18,2) vakada negatif idi. NSKHL'de MHKHL'ye göre istatistiksel olarak daha fazla olguda Cox-2 pozitifliği vardı (Fisher's Exact Test, $p=0,031$) (Tablo 12).

Cox-2 pozitifliği skoru dikkate alındığında NSKHL grubunda 4 (%36,4) vakada +1 ve 5 (%45,5) vakada +2 skor izlenirken, MHKHL'de 4 (%13,8) vakada +1 ve 7 (%24,1) vakada +2 skor tespit edildi. NSKHL'de istatistiksel olarak daha fazla olguda yaygın Cox-2 ekspresyonu saptandı (Pearson $\chi^2=0,043$) (Tablo 13). Ayrıca histolojik tipler arasında Mann Whitney U testi ile Cox-2 ekspresyonu yönünden anlamlı farklılık bulundu (Mann Whitney U, $p=0.044$).

Tablo 12: Cox-2 ekspresyonu ile histolojik alt tip ilişkisi

	Cox-2 negatif n (%)	Cox-2 pozitif n (%)	Toplam N (%)	P
MHKHL	18 (%62,1)	11 (%37,9)	29 (%100)	p=0,031
NSKHL	2 (%18,2)	9 (%81,8)	11 (%100)	
Toplam	20 (%50)	20 (%30)	40 (%100)	

Tablo 13: Cox-2 skorlaması ile histolojik alt tip ilişkisi

	Cox-2 0 N (%)	Cox-2 +1 n (%)	Cox-2 +2 n (%)	Toplam N (%)	P
MHKHL	18 (%62,1)	4 (%13,8)	7 (%24,1)	29 (%100)	p=0,043
NSKHL	2 (%18,2)	4 (%36,4)	5 (%45,5)	11 (%100)	
Toplam	20 (%50)	8 (%20)	12 (%30)	40 (%100)	

Cox-2 ekspresyonu ile cinsiyet ilişkisi incelendiğinde, KHL vakalarında 13 kadın hastadan 10'unda (%76,9) Cox-2 ekspresyonu pozitif, 3'ünde (%23,1) negatif idi; 27 erkek hastadan 10'u (%37) Cox-2 pozitif, 17'si (%63) negatif idi. Kadın hastalarda Cox-2 ekspresyonu pozitif olma oranı erkek hastalara göre istatistiksel anlamlı yüksek bulundu (Fisher's Exact Test, $p=0,041$) (Tablo 14). İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte Cox-2 ekspresyon skorlamasında +2 skoruna sahip olgular kadın cinsiyette daha fazla saptandı (Pearson χ^2 , $p=0,061$) (Tablo 15).

Tablo 14: KHL'de Cox-2 ekspresyonu ile cinsiyet ilişkisi

	Cox-2 negatif n (%)	Cox-2 pozitif n (%)	Toplam n (%)	P
Kadın	3 (%23,1)	10 (%76,9)	13 (%100)	p=0,041
Erkek	17 (%63)	10 (%37)	27 (%100)	
Toplam	20 (%50)	20 (%50)	40 (%100)	

Tablo 15: KHL'de Cox-2 skorlamasının cinsiyet ile ilişkisi

	Cox-2 0 n (%)	Cox-2 +1 n (%)	Cox-2 +2 n (%)	Toplam N (%)	P
Kadın	3 (%23,1)	4 (%30,8)	6 (%46,2)	13 (%100)	p=0,061
Erkek	17 (%63)	4 (%14,8)	6 (%22,2)	27 (%100)	
Toplam	20 (%50)	8 (%20)	12 (%30)	40 (%100)	

MHKHL'de 4 kadın hastada Cox-2 1 (%25) negatif, 2 (%50) +1, 1 (%25) +2 dağılım gösterdi; 25 erkek hastada 2 (%8) +1, 6 (%24) +2 ve 17 (%68) negatiflik izlendi. Cox-2 ekspresyonunun pozitif/negatif olması yada Cox-2 skorlaması ile cinsiyet arasında istatistiksel anlamlı farklılık yoktu. Ancak erkek hastalarda Cox-2 negatif olma oranı daha fazla idi. (Sırasıyla, Fisher's Exact Test, $p>0,05$; Pearson χ^2 , $p=0,066$).

NSKHL'de 9 kadın hastada 7'sinde (2 hasta +1, 5 hasta +2) (%77,8) Cox-2 pozitif, 2'sinde (%22,2) negatif idi; 2 erkek hastanın tümü Cox-2 için pozitif olup skoru +1 idi. NSKHL'de Cox-2 ekspresyonu veya ekspresyon skorlaması ile cinsiyet

arasında istatistiksel anlamlı ilişki yoktu (Fisher's Exact Test, $p>0,05$, Pearson χ^2 , $p>0,05$).

Cox-2 ekspresyonu ile yaş ilişkisi incelendiğinde, KHL vakalarında Spearman korelasyon testi ile Cox-2 ekspresyonu ile yaş arasında istatistiksel anlamlı negatif korelasyon saptandı ($p=0,02$, $r=-0,367$). Bununla birlikte pediatrik ve erişkin yaş dağılımları arasında Cox-2 pozitifliği/ negatifliği gösteren olgu oranları ile ekspresyon skorları yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (Fisher's Exact Test, $p>0,05$). Pediatrik yaş grubunda Cox-2 pozitifliği 5 (%62,5) (2'si +1, 3'ü +2) hastada görülürken, yetişkin yaş grubunda 15 (%46,9) (6'sı +1, 9'u +2) hastada pozitif, 17 (%53,1) hastada negatif saptandı (Tablo16, 17).

Tablo 16: KHL'de Cox-2 ekspresyonu ile yaş grubu ilişkisi

	Cox-2 negatif n (%)	Cox-2 pozitif n (%)	Toplam n (%)	p
Pediatrik yaş grubu	3 (%37,5)	5 (%62,5)	8 (%100)	p>0,05
Yetişkin yaş grubu	17 (%53,1)	15 (%46,9)	32 (%100)	
Toplam	20 (%50)	20 (%50)	40 (%100)	

Tablo 17: KHL'de Cox-2 ekspresyon skorlaması ile yaş grubu ilişkisi

	Cox-2 +0 n (%)	Cox-2 +1 n (%)	Cox-2 +2 n (%)	Toplam N (%)	P
Pediatrik yaş grubu	3 (%37,5)	2 (%25)	3 (%37,5)	8 (%100)	p>0,05
Yetişkin yaş grubu	17 (%53,1)	6 (%18,8)	9 (%28,1)	32 (%100)	
Toplam	20 (%50)	8 (%20)	12 (%30)	40 (%100)	

MHKHL'de pediatrik yaş grubunda Cox-2, 3 (%60) hastada pozitif, 2 (%40) hastada negatif; yetişkin yaş grubunda 8 (%33,3) hastada pozitif, 16 (%66,7) hastada negatif saptandı. Pediatrik yaş grubunda Cox-2 ekspresyon skorlaması 1 (%20) hastada +1, 2 (%40) hastada +2; yetişkin yaş grubunda 3 (%12,5) hastada +1, 5 (%20,8) hastada +2 saptandı. Yaş grupları arasında Cox-2 pozitifliği/negatifliği veya

Cox-2 ekspresyonu skorlaması yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (Fisher's Exact Test, $p>0,05$, Pearson $\chi^2= p>0,05$). Spearman korelasyon analizi ile MHKHL'de Cox-2 ekspresyonu ile yaş arasında anlamlı korelasyon yoktu ($p>0,05$).

NSKHL'de pediatrik yaş grubunda Cox-2 ekspresyonu 2 (%66,7) hastada pozitif, 1 (%33,3) hastada negatif; yetişkin yaş grubunda 7 (%87,5) hastada pozitif, 1 (%12,5) hastada Cox-2 negatif saptandı. Skorlamaya göre 1 (%33,3) hasta +1, 1 (%33,3) hasta +2; yetişkin yaş grubunda 3 (%37,5) hasta +1, 4 (%50) hasta +2 saptandı. Cox-2 ekspresyonunun pozitif/negatifliği yada skorlamasının yaş grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığı yoktu (Fisher's Exact Test, $p>0,05$; Pearson $\chi^2= p>0,05$). Ayrıca NSKHL'de Spearman korelasyon analizi ile Cox-2 ekspresyonu ile yaş arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Cox-2 ekspresyonu ile evre ilişkisi incelendiğinde, Spearman korelasyon testinde KHL'de Cox-2 ekspresyonu ile evre arasında anlamlı negatif korelasyon saptandı ($p=0,042$, $r=-0,328$). KHL vakalarında Cox-2 ekspresyonu pozitif 19 hastadan 12 (%63,2) ve 7'si (%36,8) sırasıyla evre II ve III idi. Cox-2 negatif olan 1 (%5), 7 (%35), 8 (%40) ve 4 (%20) hasta sırasıyla evre I, II, III ve IV idi. Cox-2 ekspresyonu ile ikili yada dördü evreleme arasında anlamlı ilişki yoktu (Sırasıyla, Fisher's Exact Test, $p>0,05$; Pearson χ^2 , $p=0,095$). Ancak düşük evreli 20 hastadan 12'si (%60) Cox-2 pozitif iken yüksek evreli 19 hastadan 7'si (%36,8) Cox-2 pozitif, 12'si (%63,2) negatif idi (Tablo 18). Ayrıca Cox-2 ekspresyon skorlama oranları ile düşük ve yüksek evreli olma arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Bununla birlikte düşük evreli 20 hastadan 9'u (%45) Cox-2 +2 skoru gösterirken, yüksek evreli 19 hastadan 2'si (%10,5) Cox-2 +2 skoruna sahipti (Pearson χ^2 , $p=0,057$) (Tablo 19).

Tablo 18: KHL'de Cox-2 ekspresyonu ile evre ilişkisi

	Cox-2 negatif n (%)	Cox-2 pozitif n (%)	Toplam n (%)	p
Düşük evre (Evre I+II)	8 (%40)	12 (%60)	20 (%100)	$p>0,05$
Yüksek evre (Evre III+IV)	12 (%63,2)	7 (%36,8)	19 (%100)	
Toplam	20 (%51,3)	19 (%48,7)	39 (%100)	

Tablo 19: KHL’de Cox-2 ekspresyonu skorlaması ile evre ilişkisi

	Cox-2 0 N (%)	Cox-2 +1 n (%)	Cox-2 +2 n (%)	Toplam n (%)	p
Düşük evre (Evre I+II)	8 (%40)	3 (%15)	9 (%45)	20 (%100)	p=0,057
Yüksek evre (Evre III+IV)	12 (%63,2)	5 (%26,3)	2 (%10,5)	19 (%100)	
Toplam	20 (%51,3)	8 (%20,5)	11 (%28,2)	39 (%100)	

MHKHL’de Cox-2, düşük evreli 11 hastadan 6’sında (%54,5) negatif, 5’inde (%45) pozitif idi; yüksek evreli 17 hastadan 12’sinde (%70,6) negatif, 5’inde (%29,4) pozitif idi. Düşük evreli 11 hastadan 1 (%9,1) ve 4’ü (%36,4) Cox-2 +1 ve +2, yüksek evreli 17 hastadan 3 (%17,6) ve 2’si (%11,8) sırasıyla Cox-2 +1 ve +2 olarak skorlandı. Cox-2 pozitif olan 10 hastada evre I ve evre IV yoktu, 5 (%50) hasta evre II, 5 (%50) hasta evre III idi. Cox-2 negatif olan 18 hastadan 1’i (%5,6) evre I, 5’i (%27,8) evre II, 8’i (%44,4) evre III, 4’ü (%22,2) evre IV idi. Cox-2 ekspresyonu ile ikili ve dördü evreleme arasında anlamlı ilişki yoktu (Sırasıyla Fisher’s Exact Test, $p>0,05$, Pearson $\chi^2=p>0,05$). Spearman korelasyon analizinde Cox-2 ekspresyonu ile evre arasında anlamlı korelasyon saptanmadı ($p>0,05$).

NSKHL’de Cox-2 ekspresyonu pozitif 9 hastadan 7’si (%77,8) evre II, 2 (%22,2) hasta evre III idi. Cox-2 negatif 2 (%100) hasta evre II idi. Düşük evreli 9 hastadan 2’sinde (%22,2) Cox-2 negatif, 7’sinde (%77,8) pozitif idi. Yüksek evreli 2 hastanın tümü (%100) Cox-2 pozitif idi. Düşük evreli 9 hastadan 2’si (%22,2) +1, 5’i (%55,6) +2, yüksek evreli 2 hasta (%100) +1 idi. Cox-2 ekspresyonu ile dördü yada düşük ve yüksek evre arasında anlamlı ilişki yoktu (Fisher’s Exact Test, $p>0,05$, Pearson $\chi^2=p>0,05$). Spearman korelasyon analizinde Cox-2 ekspresyonu ile evre arasında anlamlı korelasyon saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 20’da özetlendiği üzere KHL’de Cox-2 ekspresyonu ile histolojik alt tip ve cinsiyet arasında anlamlı ilişki saptandı. Anlamlı olmamakla birlikte düşük evreli grupta yüksek evreli gruba göre Cox-2 pozitifliği daha fazla oranda saptandı. Ayrıca Spearman korelasyon analizi ile Cox-2 ekspresyonu ile evre ve yaş arasında istatistiksel anlamlı negatif korelasyon tespit edildi.

Tablo 20: Cox-2 ekspresyonu ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki

	n=40	Cox-2 Negatif n=20 (%)	Cox-2 Pozitif n=20 (%)	p
Cinsiyet				
Erkek	27	17 (%63)	10 (%37)	p=0,041
Kadın	13	3 (%23,1)	10 (%76,9)	
Yaş				
<18	8	3 (%37,5)	5 (%62,5)	p>0,05
≥18	32	17 (%53,1)	15 (%46,9)	
Evre				
Düşük evre	20	8 (%40)	12 (%60)	p>0,05
Yüksek evre	19	12 (%63,1)	7 (%36,8)	
Histolojik alt tip				
MHKHL	29	18 (%62,1)	11 (%37,9)	p=0,031
NSKHL	11	2 (%18,2)	9 (%81,8)	

4.2.2 BCL-2 ekspresyonu

Kırk KHL’de 14 (%35) olgu BCL-2 yönünden sitoplazmik pozitif olup 26 (%65) olgu negatif idi. Bcl-2 pozitifliği gösteren bu 14 olgunun tamamı +2 skoruna sahipti.

Bcl-2 ekspresyonu histolojik alt tiplere göre değerlendirildiğinde; MHKHL’li 10 (%34,5) vakada Bcl-2 pozitif iken, 11 NSKHL’li vakanın 4’ünde (%36,4) Bcl-2 pozitifliği saptandı. Bcl-2 pozitifliği gösteren bu vakalar +2 skoruna sahipti. Histolojik alt tipler arasında Bcl-2 pozitifliği/negatifliği veya Bcl-2 ekspresyon skorlaması yönünden istatistiksel anlamlı farklılık bulunmadı (Fisher’s Exact Test, $p>0.05$) (Tablo 21).

Mann Whitney U testi ile histolojik tipler arasında Bcl-2 ekspresyonu yönünden anlamlı farklılık yoktu (Mann Whitney U, $p>0.05$).

Tablo 21: KHL’de Bcl-2 ekspresyonu ile histolojik alt tip ilişkisi

	Bcl-2 negatif n (%)	Bcl-2 pozitif n (%)	Toplam n (%)	p
MHKHL	19 (%65,5)	10 (%34,5)	29 (%100)	p>0.05
NSKHL	7 (%63,6)	4 (%36,4)	11 (%100)	
Toplam	26 (%65)	14 (%35)	40 (%100)	

Bcl-2 ekspresyonu ile cinsiyet değerlendirildiğinde, KHL vakalarında 13 kadın hastadan 5’inde (%38,5) Bcl-2 pozitif, 8’inde (%61,5) negatif idi; 27 erkek hastadan 9’unda (%33,3) Bcl-2 pozitif, 18’inde (%66,7) negatif idi. Bcl-2 ekspresyonu ile cinsiyet arasında anlamlı ilişki yoktu (Fisher’s Exact Test, $p>0,05$) (Tablo 22).

Tablo 22: KHL’de Bcl-2 ekspresyonu ile cinsiyet ilişkisi

	Bcl -2 negatif n (%)	Bcl -2 pozitif n (%)	Toplam n (%)	p
Kadın	8 (%61,5)	5 (%38,5)	13 (%100)	p>0,05
Erkek	18 (%66,7)	9 (%33,3)	27 (%100)	
Toplam	26 (%65)	14 (%35)	40 (%100)	

MHKHL’de 4 kadın hastadan 2’sinde (%50) Bcl-2 ekspresyonu pozitif, 2’sinde (%50) negatif idi; 25 erkek hastadan 8’inde (%32) Bcl-2 pozitif, 17’sinde (%68) negatif idi. NSKHL grupta 9 kadın hastadan 3’ünde (%33,3) Bcl-2 pozitif, 6’sinde (%66,7) negatif idi; 2 erkek hastadan 1’inde (%50) Bcl-2 pozitif, 1’inde (%50) negatif idi. MHKHL’de ve NSKHL’de Bcl-2 ekspresyonu ile cinsiyet arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Fisher’s Exact Test, $p>0,05$).

Bcl-2 ekspresyonu ile yaş ilişkisi incelendiğinde, Spearman korelasyon analizi ile Bcl-2 ekspresyonu ile yaş arasında anlamlı korelasyon saptanmadı ($p>0,05$). Yaş grubu dağılımı yönünden, KHL grubunda 8 vakalılık pediatrik yaş grubunda Bcl-2 3 (%37,5) hastada pozitif, 5 (%62,5) hastada negatif idi; yetişkin yaş grubunda 11 (%34,4) hastada pozitif, 21 (%65,6) hastada negatif saptandı. Yaş grubu ile Bcl-2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktu (Fisher’s Exact Test, $p>0,05$) (Tablo 23).

Tablo 23: KHL’de Bcl-2 ekspresyonu ile yaş grubu ilişkisi

	Bcl-2 negatif n (%)	Bcl-2 pozitif n (%)	Toplam n (%)	p
Pediatrik yaş grubu	5 (%62,5)	3 (%37,5)	8 (%100)	p>0,05
Yetişkin yaş grubu	21 (%65,6)	11 (%34,4)	32 (%100)	
Toplam	26 (%65)	14 (%35)	40 (%100)	

MHKHL’de pediatrik yaş grubunda Bcl-2, 3 (%60) hastada negatif, 2 (%40) hastada pozitif; yetişkin yaş grubunda 16 (%66,7) hastada negatif, 8 (%33,3) hastada pozitif saptandı. NSKHL’de pediatrik yaş grubunda Bcl-2 ekspresyonu 2 (%66,7) hastada negatif, 1 (%33,3) hastada pozitif; yetişkin yaş grubunda 5 (%62,5) hastada negatif, 3 (%37,5) hastada pozitif saptandı. MHKHL’de ve NSKHL’de yaş grubu ile Bcl-2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktu (Fisher’s Exact Test, $p>0,05$).

Bcl-2 ekspresyonu ile evre ilişkisi incelendiğinde, KHL grubunda Bcl-2 pozitif 13 hastadan 7 (%53,8), 5 (%38,5) ve 1 (%7,7) hasta sırasıyla evre II, III ve IV olup; Bcl-2 negatif olan 26 hastadan 1 (%3,8), 12 (%46,2), 10 (%38,5) ve 3 (%11,5)

hasta sırasıyla evre I, II, III ve IV idi. Düşük evreli 20 hastadan 7'sinde (%35) Bcl-2 pozitif, 13'ünde (%65) negatif idi, yüksek evreli 19 hastadan 6'sı (%31,6) Bcl-2 pozitif, 13'ünde (%68,4) negatif idi. Bcl-2 pozitifliği ile düşük ve yüksek evre veya dörtlü evreleme sistemi arasında arasında anlamlı farklılık yoktu (Sırasıyla Fisher's Exact Test, $p>0,05$; Pearson χ^2 , $p>0,05$) (Tablo 24). Ayrıca Spearman korelasyon analizi ile Bcl-2 ekspresyonu ile evre arasında anlamlı korelasyon saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 24: KHL'de Bcl-2 ekspresyonu ile evre ilişkisi

	Bcl-2 negatif n (%)	Bcl-2 pozitif n (%)	Toplam n (%)	P
Düşük evre (Evre I+II)	13 (%65)	7 (%35)	20 (%100)	p>0,05
Yüksek evre (Evre III+IV)	13 (%68,4)	6 (%31,6)	19 (%100)	
Toplam	26 (%66,7)	13 (%33,3)	39 (%100)	

MHKHL'de düşük evreli 11 hastadan 4'ünde (%36,4) Bcl-2 pozitif, 7'sinde (%63,6) negatif idi, yüksek evreli 17 hastadan 5'inde (%29,4) Bcl-2 pozitif, 12'sinde (%70,6) negatif idi. Bcl-2 ekspresyonu pozitif evre I hasta yoktu, 4 (%44,4) hasta evre II, 4 (%44,4) hasta evre III, 1 (%11,1) hasta evre IV idi. Bcl-2 ekspresyonu negatif 1 (%5,3) hasta evre I, 6 (%31,6) hasta evre II, 9 (%47,4) hasta evre III, 3 (%15,8) hasta evre IV idi. Bcl-2 ekspresyonu ile düşük ve yüksek evre yada dörtlü evre arasında anlamlı ilişki yoktu (Fisher's Exact Test, $p>0,05$; Pearson χ^2 , $p>0,05$). NSKHL grubunda Bcl-2 ekspresyonu pozitif 3 (%75) hasta evre II, 1 (%25) hasta evre III idi. Bcl-2 negatif 6 (%85,7) hasta evre II, 1 (%14,3) hasta evre III idi. Bcl-2 ekspresyonu ile evre arasında anlamlı ilişki yoktu (Fisher's Exact Test, $p>0,05$). Ayrıca Spearman korelasyon testi her iki grupta Bcl-2 ekspresyonu ile evre arasında anlamlı korelasyon saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 25’de özetlendiği gibi KHL’de Bcl-2 ekspresyonu ile klinikopatolojik parametreler arasında anlamlı ilişki bulunmadı.

Tablo 25: Bcl-2 ekspresyonu ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki

	n=40	Bcl-2 Negatif n=26 (%)	Bcl-2 Pozitif n=14 (%)	p
Cinsiyet				
erkek	27	18 (%66,7)	9 (%33,3)	p>0,05
kadın	13	8 (%61,5)	5 (%38,5)	
Yaş				
<18	8	5 (%62,5)	3 (%37,5)	p>0,05
≥18	32	21 (%65,6)	11 (%34,4)	
Evre				
Düşük evre	20	13 (%65)	7 (%35)	p>0,05
Yüksek evre	19	13 (%68,4)	6 (%31,5)	
Histolojik alt tip				
MHKHL	29	19 (%65,5)	10 (%34,5)	p>0.05
NSKHL	11	7 (%63,6)	4 (%36,4)	

4.2.3 LMP-1 ekspresyonu

LMP-1 immünpozitifliği HRS hücrelerinde sitoplazmik, membranöz veya golgi zon boyanması şeklinde idi. LMP-1 40 vakadan 23'ünde (%57,5) pozitif, 17'sinde (%42,5) negatif idi. Histolojik tiplere göre LMP-1; MHKHL'li 22 (%75,9) vakada pozitif, 7 (%24,1) vakada negatif idi ve NSKHL'li 1 (%9,1) vakada pozitif, 10 (%90,9) vakada negatif saptandı. Histolojik alt tipler arasında LMP-1 ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu. MHKHL'de daha fazla olguda LMP-1 pozitifliği vardı (Fisher's Exact Test, $p < 0,001$) (Tablo 26).

Tablo 26: KHL'de LMP-1 ekspresyonu ile histolojik alt tip ilişkisi

	LMP-1 negatif	LMP-1 pozitif	Toplam	p
	N (%)	n (%)	n (%)	
MHKHL	7 (%24,1)	22 (%75,9)	29 (%100)	$p < 0,001$
NSKHL	10 (%90,9)	1 (%9,1)	11 (%100)	
Toplam	17 (%42,5)	23 (%57,5)	40 (%100)	

LMP-1 ile cinsiyet değerlendirildiğinde, KHL vakalarında 13 kadın hastadan 8'inde (%61,5) LMP-1 negatif, 5'inde (%38,5) pozitif idi, 27 erkek hastadan 9'unda (%33,3) LMP-1 negatif, 18'inde (%66,7) pozitif idi. LMP-1 ekspresyonu ile cinsiyet arasında istatistiksel anlamlı ilişki yoktu (Fisher's Exact Test, $p > 0,05$). (Tablo 27)

Tablo 27: KHL'de LMP-1 ekspresyonu ile cinsiyet ilişkisi

	LMP-1 negatif	LMP -1 pozitif	Toplam	p
	n (%)	n (%)	n (%)	
Kadın	8 (%61,5)	5 (%38,5)	13 (%100)	$p > 0,05$
Erkek	9 (%33,3)	18 (%66,7)	27 (%100)	
Toplam	17 (%42,5)	23 (%57,5)	40 (%100)	

MHKHL'de 4 kadın hastadan tümü LMP-1 pozitif idi, 25 erkek hastadan 18'i (%72) LMP-1 pozitif, 7'si (%28) negatif idi. NSKHL'de 9 kadın hastadan 8'i (%88,9) LMP-1 negatif, 1'i (%11,1) pozitif idi, 2 erkek hastadan tümü (%100) LMP-

1 negatif idi. Her iki alt tipte LMP-1 ekspresyonu ile cinsiyet arasında istatistiksel anlamlı ilişki yoktu (Fisher's Exact Test, $p>0,05$).

LMP-1 ile yaş dağılımı incelendiğinde, KHL vakalarında pediatrik yaş grubundaki 8 hastanın 5'inde (%62,5) LMP-1 pozitif, 3 (%37,5) hastada negatif, yetişkin yaş grubunda 18 (%56,3) hastada LMP-1 pozitif, 14 (%43,8) hastada negatif saptandı. Yaş grupları ile LMP-1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktu (Fisher's Exact Test, $p>0,05$) (Tablo 28).

Tablo 28: KHL'de LMP-1 ekspresyonu ile yaş grubu ilişkisi

	LMP-1 negatif	LMP-1 pozitif	Toplam	p
	n (%)	n (%)	n (%)	
Pediatrik yaş grubu	3 (%37,5)	5 (%62,5)	8 (%100)	p>0,05
Yetişkin yaş grubu	14 (%43,8)	18 (%56,3)	32 (%100)	
Toplam	17 (%42,5)	23 (%57,5)	40 (%100)	

MHKHL'de pediatrik yaş grubunda LMP-1 pozitif 5 (%100) hasta vardı, LMP-1 negatif hasta yoktu; yetişkin yaş grubunda LMP-1 pozitif 17 (%70,8), LMP-1 negatif 7 (%29,2) hasta saptandı. NSKHL'de pediatrik yaş grubunda LMP-1 pozitif hasta yoktu, LMP-1 negatif 3 (%100) hasta vardı, yetişkin yaş grubunda LMP-1 pozitif 1 (%12,5), LMP-1 negatif 7 (%87,5) hasta saptandı. MHKHL ve NSKHL'de yaş grupları ile LMP-1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktu (Fisher's Exact Test, $p>0,05$).

LMP-1 ekspresyonu ile evre dağılımı incelendiğinde, KHL grubunda LMP-1 pozitif 22 hastadan 10 (%45,5), 9 (%40,9) ve 3'ü (%13,6) sırasıyla evre II, III ve IV idi. LMP-1 negatif 17 hastadan 1 (%5,9), 9 (%52,9), 6 (%35,3) ve 1'i (%5,9) sırasıyla evre I, II, III ve IV idi. Düşük evreli 20 hastadan 10'u (%50) LMP-1 negatif, 10'u (%50) pozitif; yüksek evreli 19 hastadan 7'si (%36,8) LMP-1 negatif, 12'si (%63,2) LMP-1 pozitif idi. LMP-1 ekspresyonu ile yüksek ve düşük evre yada dördü evreleme arasında anlamlı farklılık yoktu (Sırasıyla, Fisher's Exact Test, $p>0,05$; Pearson χ^2 , $p>0,05$) (Tablo 29).

Tablo 29: KHL’de LMP-1 ekspresyonu ile evre ilişkisi

	LMP-1 negatif n (%)	LMP-1 pozitif N (%)	Toplam n (%)	p
Düşük evre (Evre I+II)	10 (%50)	10 (%50)	20 (%100)	p>0,05
Yüksek evre (Evre III+IV)	7 (%36,8)	12 (%63,2)	19 (%100)	
Toplam	17 (%43,6)	22 (%56,4)	39 (%100)	

MHKHL’de LMP-1 pozitif evre I hasta yoktu, 9 (%42,9) hasta evre II, 9 (%42,9) hasta evre III, 3 (%14,3) hasta evre IV idi. LMP-1 negatif 1 (%14,3) hasta evre I, 1(%14,3) hasta evre II, 4 (%57,1) hasta evre III, 1 (%14,3) hasta evre IV idi. Düşük evreli 11 hastadan 9’u (%81,8) LMP-1 pozitif, 2’si (% 18,2) negatif; yüksek evreli 17 hastadan 12’si (%70,6) LMP-1 pozitif, 5’i (%29,4) negatif idi. NSKHL’de LMP-1 pozitif evre I, III ve IV hasta yoktu, pozitif olan 1 (%100) hasta evre II idi. LMP-1 negatif evre I ve IV hasta yoktu, 8 (%80) hasta evre II, 2 (%20) hasta evre III idi. Her iki grupta LMP-1 ekspresyonu ile evre arasında anlamlı istatistiksel farklılık yoktu (Fisher’s Exact Test, p>0,05).

Tablo 30’da KHL’de LMP-1 ekspresyonunun klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi özetlenmiştir. MHKHL alt tipinde NSKHL’ye göre istatistiksel olarak anlamlı daha fazla olguda LMP-1 pozitifliği bulunmuştur. Evre, yaş grubu ve cinsiyet ile anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Tablo 30: LMP-1 ekspresyonu ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki

	n=40	LMP-1 Negatif N=17 (%)	LMP-1 Pozitif n=23 (%)	P
Cinsiyet				
Erkek	27	9 (%52,9)	18 (%78,3)	p>0,05
Kadın	13	8 (%47,1)	5 (%21,7)	
Yaş				
<18	8	3 (%37,5)	5 (%62,5)	p>0,05
≥18	32	14 (%43,8)	18 (%56,3)	
Evre				
Düşük evre	20	10 (%50)	10 (%50)	p>0,05
Yüksek evre	19	7 (%36,8)	12 (%63,1)	
Histolojik alt tip				
MHKHL	29	7 (%24,1)	22 (%75,9)	p<0,001
NSKHL	11	10 (%90,9)	1 (%9,09)	

4.2.4. COX-2, BCL-2 ve LMP-1 ekspresyonları arasındaki ilişki

Cox-2 ile Bcl-2 ekspresyonları incelendiğinde, KHL'lerde Cox-2 pozitif 20 vakada; Bcl-2, 9 (%45) hastada pozitif, 11 (%55) hastada negatif; Cox-2 negatif 20 vakada Bcl-2 5 (%25) hastada pozitif, 15 (%75) hastada negatif saptandı. Cox-2 ekspresyonu ile Bcl-2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktu (Fisher's Exact Test, $p>0,05$). Ayrıca Spearman korelasyon analizinde Cox-2 ve Bcl-2 ekspresyon skorlaması arasında anlamlı korelasyon saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 31).

Tablo 31: KHL'de Cox-2 ile Bcl-2 ekspresyonu ilişkisi

	Bcl-2 negatif n (%)	Bcl-2 pozitif n (%)	Toplam n (%)	p
Cox-2 negatif	15 (%75)	5 (%25)	20 (%100)	p>0,05
Cox-2 pozitif	11 (%55)	9 (%45)	20 (%100)	
Toplam	26 (%65)	14 (%35)	40 (%100)	

MHKHL grubunda 11 Cox-2 pozitif vakada; Bcl-2 5 (%45,5) hastada pozitif, 6 (%54,5) hastada negatif saptandı. Cox-2 negatif 18 vakada Bcl-2 13 (%72,2) hastada pozitif, 5 (%27,8) hastada negatif izlendi. NSKHL grupta 9 Cox-2 pozitif vakada, Bcl-2 4 (%44,4) hastada pozitif, 5 (%55,6) hastada negatif; 2 Cox-2 negatif hastanın tümünde (%100) Bcl-2 negatif saptandı. MHKHL'de ve NSKHL'de Cox-2 ekspresyonu ile Bcl-2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktu (Fisher's Exact Test, $p>0,05$).

Cox-2 ile LMP-1 ilişkisi incelendiğinde, KHL vakalarında 23 LMP-1 pozitif vakada, Cox-2 11 (%47,8) hastada pozitif, 12 (%52,2) hastada negatif; 17 LMP-1 negatif vakada, Cox-2 9 (%52,9) hastada pozitif, 8 (%47,1) hastada negatif saptandı. LMP-1 pozitif vakalarda 3 (%13) ve 8 (%34,8) hastada Cox-2 ekspresyonu sırasıyla +1, +2; LMP-1 negatif vakalarda Cox-2 ekspresyonu 5 (%29,4) hastada +1, 4 (%23,5) hastada +2 saptandı. LMP-1 ekspresyonu ile Cox-2 pozitifliği ya da Cox-2 ekspresyon skorlaması arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktu (Fisher's Exact Test, $p>0,05$) (Tablo 32).

Tablo 32: KHL’de Cox-2 ile LMP-1 ekspresyonu arasındaki ilişki

	Cox-2 negatif n (%)	Cox-2 pozitif N (%)	Toplam n (%)	p
LMP-1 negatif	8 (%47,1)	9 (%52,9)	17 (%100)	p>0,05
LMP-1 pozitif	12 (%52,2)	11 (%47,8)	23 (%100)	
Toplam	20 (%50)	20 (%50)	40 (%100)	

MHKHL’de LMP-1 pozitif 22 vakada, Cox-2, 10 (%45,5) hastada pozitif, 12 (%54,5) hastada negatif; LMP-1 negatif 7 vakada, Cox-2, 1 (%14,3) hastada pozitif, 6 (%85,7) hastada negatif saptandı. LMP-1 pozitif vakalarda Cox-2 ekspresyonu 3 (%10,3) hastada +1, 7 (%31,8) hastada +2; LMP-1 negatif vakalarda 1 (%14,3) hastada +1 olarak skorlandı, +2 olarak skorlanan hasta yoktu. MHKHL’de LMP-1 ve Cox-2 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Fisher’s Exact Test, p>0,05, Pearson χ^2 , p>0,05).

NSKHL’de LMP-1 pozitif 1 vaka Cox-2 pozitif idi; LMP-1 negatif 10 vakada Cox-2 ekspresyonu 2 (%20) hastada 0, 4 (%40) hastada +1, 4 (%40) hastada +2 olarak dağılım gösterdi. NSKHL’de LMP-1 ekspresyonu ile Cox-2 ekspresyonu ya da Cox-2 ekspresyonu skorlaması arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktu (Fisher’s Exact Test, p>0,05, Pearson χ^2 , p>0,05).

Bcl-2 ile LMP-1 ilişkisi incelendiğinde, KHL vakalarında 23 LMP-1 pozitif vakanın 15’inde (%65,2) Bcl-2 negatif, 8’inde (%34,8) pozitif; 17 LMP-1 negatif vakanın 11’inde (%64,7) Bcl-2 negatif, 6’sında (%35,3) pozitif saptandı. LMP-1 ekspresyonu ile Bcl-2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktu (Fisher’s Exact Test, p>0,05) (Tablo 33).

Tablo 33: KHL’de LMP-1 ile Bcl-2 ekspresyonu arasındaki ilişki

	Bcl-2 negatif n (%)	Bcl-2 pozitif n (%)	Toplam n (%)	p
LMP-1 negatif	11 (%64,7)	6 (%35,3)	17 (%100)	p>0,05
LMP-1 pozitif	15 (%65,2)	8 (%34,8)	23 (%100)	
Toplam	26 (%65)	14 (%35)	40 (%100)	

MHKHL’de LMP-1 pozitif 22 vakada, Bcl-2 14 (%63,6) hastada negatif, 8 (%36,4) hastada pozitif; LMP-1 negatif 7 vakada 5 (%71,4) hastada negatif, 2 (%28,6) hastada pozitif saptandı. NSKHL grubunda LMP-1 ekspresyonu pozitif 1 vakada Bcl-2 ekspresyonu yoktu. LMP-1 ekspresyonu negatif 10 vakanın 6’sında (%60) Bcl-2 negatif, 4’ünde (%40) pozitif. MHKHL ve NSKHL’de LMP-1 ile Bcl-2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktu (Fisher’s Exact Test, $p>0,05$).

4.2.5. Sağkalım Analizi

Çalışmadaki 40 KHL vakasının 34'ünde (%85) sağkalım ile ilgili bilgiler edinildi. Altı hasta takip dışı olup arşiv dosyalarından ya da bizzat kendilerine ulaşamadığından elde edilemedi. Çalışma sonunda ulaşabildiğimiz 34 hastadan 28'i (%82,4) yaşıyordu, 6 (%17,6) hasta eksitus olmuştu. Sağkalım süreleri 1-91 ay (ortalama $29,2 \pm 24,5$) arasında değişim göstermekteydi.

MHKHL'li 29 hastanın 23'ünde sağkalım bilgilerine ulaşıldı. Bunların 17'si halen yaşamakta olup ölen 6 hastanın tümü MHKHL alt tipinde idi. Sağkalım süreleri 1-91 ay (ortalama $28,7 \pm 26,3$). NSKHL'li 11 hastanın tümü çalışma sonunda yaşıyordu ve sağkalım süreleri 1-72 ay (ortalama $30,3 \pm 21,2$) arasında değişti.

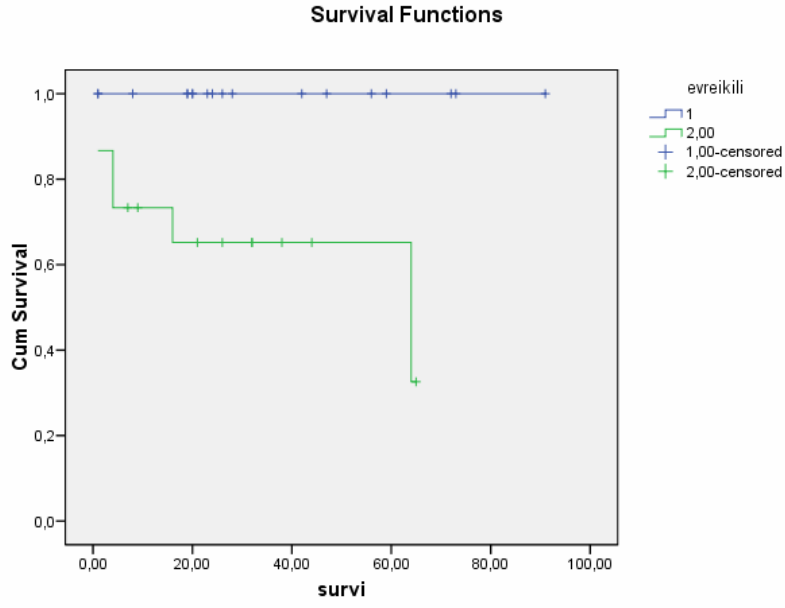
KHL olgularında histolojik tip, yaş grubu, cinsiyet, evre, Cox-2, Bcl-2 ve LMP-1 ekspresyonları Kaplan Meier log rank testi ile analiz edildi. İki gruba ayrılan düşük/yüksek evre ya da dördü evreleme sisteminde gruplar arasında sağkalım yönünden istatistiksel anlamlı farklılık saptandı (sırasıyla, Log Rank, $p=0,004$, $p=0,041$). Eksitus olan 6 hastanın tamamı yüksek evreli grupta idi, düşük evreli grupta eksitus yoktu (Şekil 1). Dördü evrelemeye göre eksitus olan 6 hastanın 4'ü evre III, 2'si evre IV idi (Şekil 2).

Histolojik alt tip ile sağkalım incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte eksitus olmuş 6 hastanın tamamı MHKHL grubunda idi, NSKHL hastalarının tümü halen yaşamaktaydı (Log Rank, $p=0,088$).

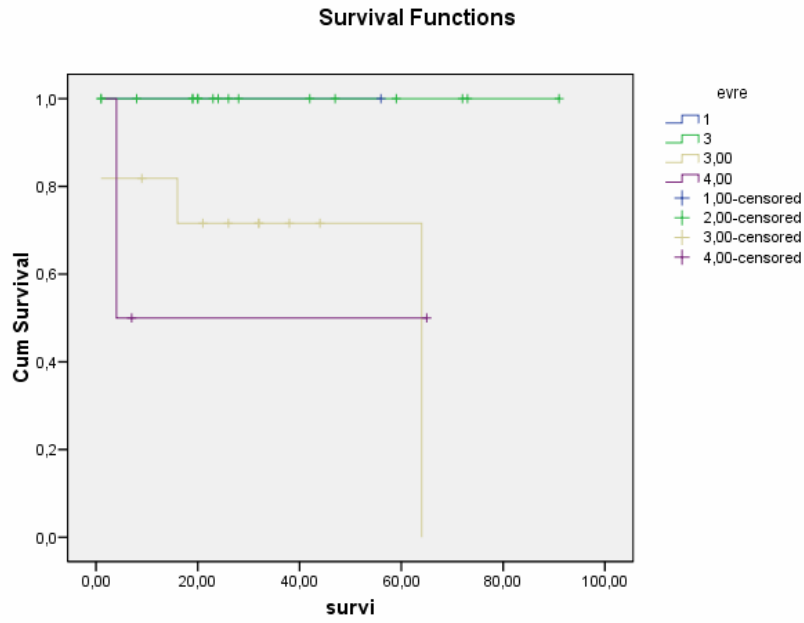
Cox-2 ekspresyonu ile sağkalım arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı. Eksitus olmuş 6 olgu Cox-2 ekspresyonu göstermeyen grupta iken Cox-2 pozitifliği gösteren olguların tamamı yaşıyordu (Log Rank, $p=0,010$) (Şekil 3).

Bcl-2 ve LMP-1 ekspresyonları, yaş grubu ve cinsiyet ile sağkalım arasında istatistiksel anlamlı ilişki yoktu (Log Rank $p>0,05$).

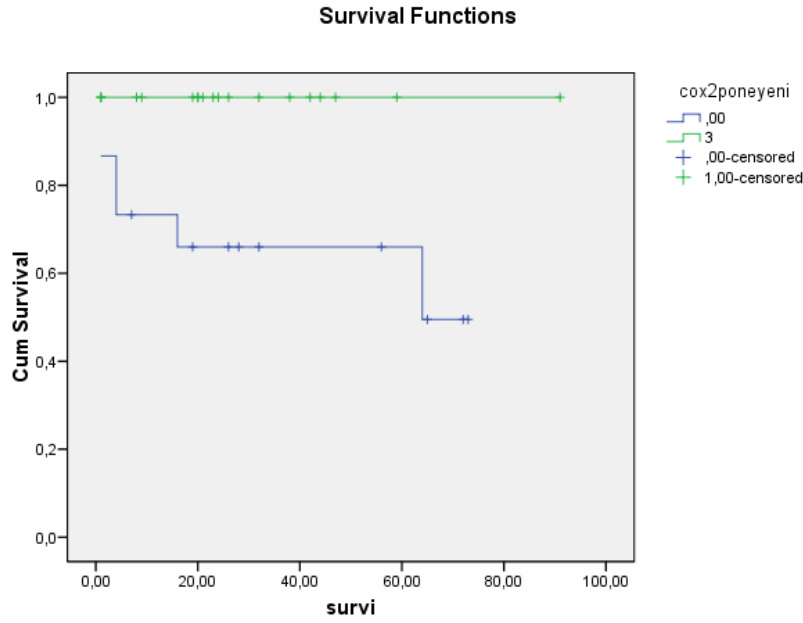
Evre, Cox-2, Bcl-2 ve LMP-1 parametrelerini içeren Cox regresyon analizinde istatistiksel anlamlı bağımsız prognostik parametre saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 34).



Şekil 1: KHL’de düşük ve yüksek evre ile sağkalım ilişkisi



Şekil 2: KHL’de dörtlü evre ile sağkalım ilişkisi

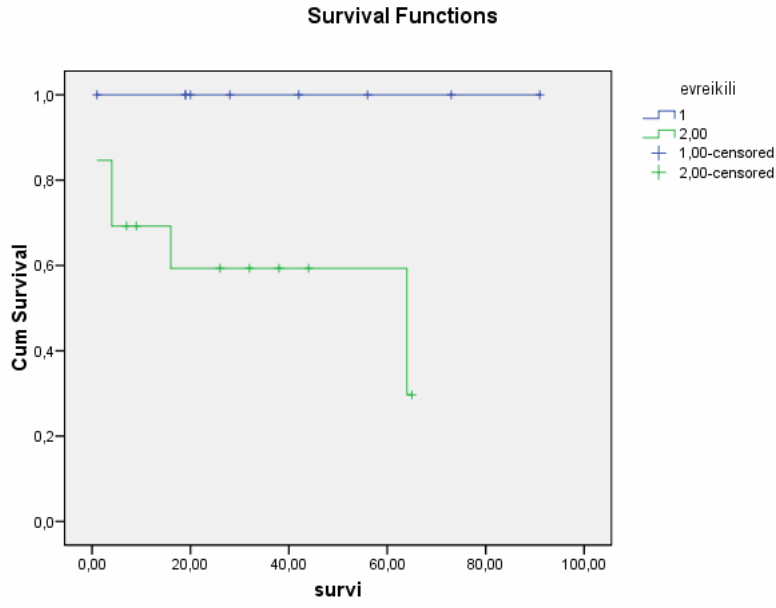


Şekil 3: KHL’de Cox-2 pozitif / negatifliği ile sağkalım ilişkisi

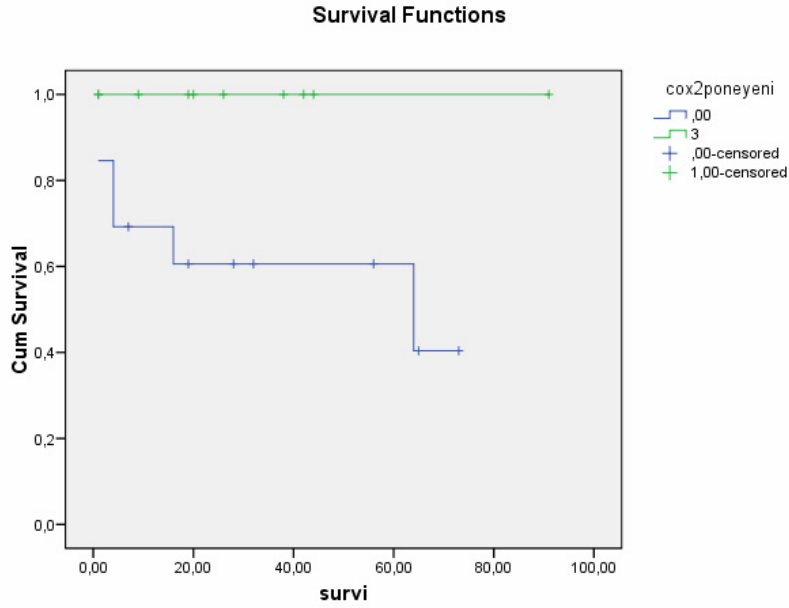
Tablo 34: KHL’de Cox-Regresyon analizi sonuçları

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)
LMP-1 +/-	-,827	1,033	,642	1	,423	,437
COX-2 +/-	-11,743	167,257	,005	1	,944	,000
BCL-2 +/-	-1,301	1,336	,947	1	,330	,272
Evre I-II / III-IV	12,628	169,370	,006	1	,941	305106,8

MHKHL olgularında yaş grubu, cinsiyet, evre, Cox-2, Bcl-2 ve LMP-1 ekspresyonları Kaplan Meier log rank testi ile analiz edildiğinde düşük/yüksek evre ile sağkalım arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı. Yüksek evreli grupta daha fazla eksitus vardı (Log Rank $p=0,024$) (Şekil 4). Cox-2 negatif olgularda Cox-2 pozitif olanlara göre daha fazla istatistiksel anlamlı eksitus görüldü (Log Rank $p=0,038$). Diğer parametreler ile sağkalım arasında anlamlı ilişki yoktu (Log Rank $p>0,05$) (Şekil 5). Evre, Cox-2, Bcl-2 ve LMP-1 ekspresyonlarını içeren Cox regresyon analizinde istatistiksel anlamlı prognostik parametre saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 35).



Şekil 4: MHKHL’de düşük ve yüksek evre ile sağkalım ilişkisi



Şekil 5: MHKHL’de Cox-2 ekspresyonu ile sağkalım ilişkisi

Tablo 35: MHKHL’de Cox-Regresyon analizi sonuçları

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)
LMP-1 + / -	-,827	1,033	,642	1	,423	,427
COX-2 + / -	-12,077	279,389	,002	1	,966	,000
BCL-2 + / -	-1,301	1,336	,947	1	,330	,272
Evre I-II / III-IV	12,987	276,919	,002	1	,963	436616.7

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hodgkin lenfoma kompleks bir lenfoproliferatif hastalıktır. En fazla tedavi edilebilir malignensiler arasında olmasına rağmen en iyi başlangıç tedavi seçeneğinin uzun dönemdeki sonuçları hakkında anlaşmazlık vardır. İlerlemiş hastalığı olanların yaklaşık %30-40'ı primer rezistan veya relaps yapan hastalık olmadığı halde agresif tedavi yaklaşımına ihtiyaç duyar. Diğer taraftan yoğun kemoterapi kombinasyonu, uzun dönemde sekonder malignensileri de içeren artmış morbidite riski taşır (4).

Gelişmiş ülkelerde NSKHL baskın histolojik alt tiptir ve genç yetişkin yaş insidens piki gösterir. Gelişmekte olan ülkelerde ise MHKHL çocuklarda ve daha yaşlı yetişkinlerde nispeten daha fazla görülür (40). Bizim çalışmamız sadece MHKHL ve NSKHL alt tiplerini içermiştir. Bunlardan MHKHL %72,5 oran ile fazla olan alt tiptir, NSKHL ise olguların %27,5'ini oluşturmuştur.

KHL'li 40 vakamızdan %67,5'u erkek, %32,5'u kadın hastadan oluşmakta idi. Önceki araştırmalarla uyumlu olarak çalışmamızda erkek baskınlığı vardı (31, 40). Diğer taraftan histolojik alt tipler arasında da cinsiyet yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. Erkeklerde kadınlara oranla MHKHL olma oranı, kadınlarda da NSKHL olma oranı anlamlı olarak daha fazla idi. Gelişmekte olan ülkelerde KHL 1. pikini en yüksek sıklıkla çocuklarda, 2. pikini 15-40 yaşlarında, 3. pikini en az sıklıkla ileri yaşlarda yapar. ABD'de bimodal yaş eğrisi vardır, 15-35 ve 70'li yaşlarda iki kez pik yapar (7). Vakalarımızdan %80 hasta 18 yaşın üzerinde, %20 hasta 18 yaşın altında idi. Ortalama yaş dağılımları KHL, MHKHL ve NSKHL'de sırasıyla 36.8, 41.9 ve 23.3 olarak saptandı. Bu bulgular alt tiplerde görülen farklı epidemiyolojik özelliklerle uyumludur.

Hodgkin lenfomada evreleme hastalığın yaygınlığını tespit etmede, hastalara verilecek terapötik ajanların belirlenmesinde ve prognozu belirlemede en önemli parametredir (8). Çalışmamızda 40 KHL vakasının 39'unda evreleme yapılabildiği görülmüştür. Bir olgu konsültasyon olgusu olup takip dışı kalmış ve hastaya ulaşılamamıştır. Evreleme düşük ve yüksek evre olmak üzere iki gruba ayrıldığında MHKHL'de yüksek evreli olgu oranı NSKHL'ye göre istatistiksel olarak anlamlı fazla bulundu. 28 MHKHL vakasından 17'si (%60,7) yüksek evreli, 11 NSKHL vakasından 9'u (%81,8) düşük evreli idi. Bununla birlikte dörtlü evreleme sistemi dikkate

alındığında iki histolojik alt tip arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı. MHKHL olgularının %46.4 ve %14.3'ü evre III ve evre IV'te olup, NSKHL'de %18.2 olgu evre III'de idi, evre IV olgu yoktu. Histolojik alt tipler arasında yüksek ve düşük evreli olma açısından farklılığın olması, ancak dörtlü evreleme ile anlamlı ilişkinin bulunmamasının vaka sayısının azlığından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bulgularımız MHKHL olgularının genellikle yüksek evrede saptanmaları bulgusu ile uyumlu olup, KHL'de histolojik alt tip vermenin evre yönünden önemini göstermektedir.

Diğer taraftan çalışmamızda toplam 40 KHL vakasından 34'ünde sağkalım bilgilerine ulaşıldı, bunlardan 6 vaka ölmüştü, 28 vaka yaşıyordu. Evre ile sağkalım arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı. Düşük ve yüksek evreli grup ya da dörtlü evreleme sistemi içerisindeki gruplar arasında sağkalım yönünden anlamlı farklılık vardı. Eksitus olan 6 hastanın tamamı yüksek evreli grupta idi, düşük evreli grupta eksitus yoktu. Ayrıca dörtlü evrelemeye göre eksitus olan 6 hastanın 4'ü evre III, 2'si evre IV idi. Bu bulgular evrelemenin KHL'de hastaların prognozunu belirlemedeki önemini birkez daha doğrulamaktadır. Ayrıca istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte eksitus olmuş 6 hastanın tamamının MHKHL grubunda olması bu alt tipin klinik seyrini ortaya koyabilir.

Hodgkin lenfomada klinik seyri daha iyi tahmin edebilmek ve tedaviyi belirlemede faydalı olabilecek biyolojik özellikler mümkün olduğunca tanımlanmaya çalışılmaktadır. Farklı çalışma grupları HL'larda değişik biyolojik belirleyicilerin potansiyel kullanımlarını araştırmaktadırlar. Son zamanlarda literatürde Cox-2 ile ilgili çalışmalar dikkati çekmektedir. Cox-2, iki "Cyclooxygenase" izoformlarından biridir, hızlıca inflamasyon esnasında mikrobik ürünler ve bazı sitokinler tarafından up-regüle edilebilir ve bu nedenle 'acil-erken' cevap geni olarak sınıflandırılır. Cox-2 ekspresyonu geçmişte kronik ve güçsüzleştirici inflamatuvar bozukluklar ile ilişkilendirilmiştir. Günümüzde Cox-2 enzimi 'pro-inflamatuvar' özelliği nedeniyle kullanılmaktadır. Yeni ortaya çıkan bilgilere göre, Cox-2'nin aslında hem pro-, hem de anti-inflamatuvar özelliklerinin olduğu, ve bu durumun enzim inhibisyonunun hem faydalı hem zararlı özelliklerini engellediğini düşündürmektedir (43). İlginç ve incelenmekte olan yeni bir kavram kronik Cox-2 ekspresyonunun malignensiye predispozan ve tümör ilerlemesi ile ilişkili olduğudur (5, 43). Tümör başlatıcıları,

sitokinler, endotoksin ve büyüme faktörleri gibi mitojenik veya inflamatuvar uyarılara cevapta Cox-2 geninin hızlı bir şekilde salınımı artar (18). Çalışmalarda kolon (44), akciğer (45), meme (46), pankreas (47) gibi çeşitli kanserlerde Cox-2'nin aşırı ekspresyonu bildirilmiştir. Asetilsalisilik asit ve diğer nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar gibi Cox'un nonspesifik inhibitörleri ile tümör hücre büyümesi engellenebilmektedir (48). Buna paralel olarak Cox-2'nin nonselektif inhibitörleri (Sulindak) ve selektif inhibitörlerinin (Celecoxib) herediter familyal adenomatöz polipozis (FAP) sendromlu hastalarda kolonik poliplerin sayısını azaltmada yüksek derecede efektif olduğu kanıtlanmıştır (15).

Lenfomalarda Cox-2'yi araştıran çalışmalar genellikle NHL olgularında yapılmıştır. Hazar ve ark.'larının (19) yaptığı çalışmada 52 hastadan 10'u KHL, 42'si NHL vakalarından oluşmakta idi. Bu çalışmada NHL'larda Cox-2 ekspresyonu ile prognostik faktörler arasında klinik korelasyon tespit edilmiştir. Cox-2 ile hastalığın evresi arasında korelasyon bulunmuş, evre arttıkça Cox-2 ekspresyonunun da arttığı izlenmiştir. Çalışmada tedaviye tam cevap hızı Cox-2 negatif hastalarda Cox-2 pozitif gruba göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (19). Paydas ve ark.'larının (20) 177 vakalık NHL serisinde yaptıkları çalışmada Cox-2 ekspresyonu ile agresif histoloji arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Düşük dereceli morfoloji gösteren vakaların yaklaşık yarısında Cox-2 negatif iken, Cox-2 pozitif vakaların 2/3'ünde agresif histoloji izlenmiştir. Ayrıca yüksek Cox-2 ekspresyonu ile karşılaştırıldığında, düşük Cox-2 ekspresyonlu veya Cox-2 ekspresyonu olmayan vakaların sağkalım sürelerinin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (20). Cox-2 ekspresyonunun ekstranodal naturel killer (NK)/T-hücre lenfomalarında tedaviye yanıtta negatif bir prognostik faktör olduğu, yüksek rekürrens ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu yayınlanmıştır (21). Bununla birlikte literatürde Hodgkin lenfoma olgularını içeren sadece üç makale bulunabilmiştir (5, 19, 22). Bunlardan biri Hazar ve ark.'larının (19) yayınladığı yukarıda bahsedilen HL ve NHL vakalarından oluşan çalışmasıdır. Bu çalışmada sadece 10 Hodgkin lenfoma olgusu yer almış, bunların %70'inde Cox-2 pozitifliği saptanmıştır. Ohsawa ve ark.'larının (5) çalışmasında, 31 KHL vakasından 15'inde HRS hücrelerinde Cox-2 ekspresyonu gösterilmiştir. HRS hücrelerinde Cox-2 ekspresyonunun Ki67 ile saptanan hücre proliferasyonu ve angiogenez ile ilişkisini

tespit etmişlerdir. Bu çalışmada Ki-67 pozitif HRS hücreleri ve mikrodamar yoğunluğu Cox-2 negatif gruba göre, Cox-2 skor 2-4 grupta anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır (5). Ayrıca Hsu ve ark.'ları (22) KHL'deki RS hücrelerinde Cox ürünlerinden özellikle PG E2'nin Hodgkin lenfomada hücrel immünite düzenlenmesinde rol oynayabileceğini yayınlamıştır. Bu çalışmalarda görüldüğü üzere KHL'de Cox-2 ekspresyonunun klinikopatolojik verilerle ilişkisi ortaya konmamaktadır.

Bizim çalışmamızda 40 vakanın 20'sinde (%50) Cox-2 ekspresyonu izlendi. Ohsawa ve ark.'larının (5) çalışmasında 31 KHL vakasından %48,3'ünde, Hazar ve ark.'larının (19) çalışmasında 10 KHL vakasından %70'inde Cox-2 pozitifliği izlenmiştir. Çalışmamızda KHL histolojik alt tipleri arasında Cox-2 pozitif ve negatif olan olgu oranları yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. NSKHL'de MHKHL'ye göre anlamlı olarak daha fazla olgu Cox-2 pozitifliği gösterdi. Ayrıca NSKHL'de yaygın (+2 skor) Cox-2 ekspresyonu gösteren olgular da istatistiksel olarak daha fazla idi. Bu bulgular KHL alt tipleri arasındaki Cox-2 ekspresyonun farklılığını işaret etmektedir. Bu farklılık, NSKHL ile MHKHL alt tiplerin hücrel zemin farklılığına bağlı olabileceği gibi, bu alt tiplerin biyolojik gelişim ve etyolojileri gibi başka nedenlere de bağlı olabilir. Bununla birlikte çalışmamızda sadece NSKHL ve MHKHL alt tipleri bulunmaktadır. Daha fazla sayıda ve diğer alt tipleri içeren çalışmalara ihtiyaç vardır. Literatürde buna ait bilgiler yoktur, bu bulgular ilk verilerdir.

Çalışmamızdaki diğer bir bulgumuz Cox-2 pozitifliği kadın hastalarda erkek hastalara göre anlamlı olarak daha yüksek oranda pozitif bulundu. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte Cox-2 ekspresyonunun skorlamasında da +2 skoruna sahip olgular kadın cinsiyette daha fazla saptandı. Bu bulgular, çalışmamızda Cox-2 pozitifliğinin anlamlı olarak NSKHL olgularında daha fazla olması ve ayrıca NSKHL olgularımızın kadın cinsiyette anlamlı fazla görülme sıklığı bulgularımız ile uyumlu özelliktedir.

Çalışmamızda Cox-2 ekspresyon skorlaması ile evre arasında istatistiksel anlamlı negatif korelasyon bulundu, evre arttıkça Cox-2 azalıyordu. Diğer taraftan yüksek ve düşük evre ile Cox-2 pozitif ve negatif olma oranları arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamakla birlikte Cox-2 negatif olguların %60'ı yüksek evrede

iken, Cox-2 pozitif %63.2'si düşük evrede dağılım gösterdi. Bu durumun vaka sayımızın az olmasına bağlı olabileceği düşünüldü. Ayrıca düşük evreli 20 hastadan 9'u (%45) Cox-2 skor +2 iken, yüksek evreli 19 hastadan 2'si (%10.5) Cox-2 skor +2 idi. Üstelik sağkalım analizinde Cox-2 negatifliğinin KHL vakalarında ve MHKHL grubunda anlamlı kötü prognostik bir parametre olduğu saptandı. Eksitus olan 6 olgunun tamamı Cox-2 negatif iken, Cox-2 pozitifliği gösteren olguların tamamı yaşıyordu. Bu nedenle, bulgularımız Cox-2 ekspresyonunun KHL'de hastalığın seyrini belirlemede kullanışlı parametrelerden biri olabileceğini düşündürmektedir.

Apopitoz programlanmış hücre ölümüdür (11). İki ana apopitoz sinyal yolu vardır; ölüm reseptörüne bağımlı apopitoz ve mitokondria bağımlı apopitoz. Apopitozun mitokondri aracılı yolu anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1) ve pro-apoptotik proteinlerden (Bax, Bad ve Bak) oluşan Bcl-2 ailesi tarafından regüle edilir ve Bcl-2, apopitozu Bax/Bak ile etkileşerek ve inaktif heterodimerler oluşturarak inhibe eder. Apopitoz önleyici protein olarak Bcl-2'nin sitozole sitokrom c salınımını önlediği ve kaspas 9'un ardışık aktivasyonunu önlediği gösterilmiştir. PG E2'nin apopitozu insan kolonik kanser hücre serisinde Bcl-2 bağımlı yol ile inhibe ettiği bulunmuştur (49).

Bcl-2 geni mitokondride yerleşmiş bir anti-apoptotik moleküldür. Anti-apoptotik fonksiyonlarını, sitokrom-c nin mitokondrial salınımını düzenleyerek ve apopitoz aktive edici faktörün (Apaf-1) kaspas 9 ve Bax (Bcl-2 ilişkili x proteini) ile etkileşimini düzenleyerek gösterir. HRS hücrelerinde Bcl-2 ekspresyonu ile sonuçlanan genetik mekanizma bilinmemektedir. Germinal merkez B hücrelerinin HRS hücrelerinin hücrel orijini olduğu gösterilmiştir. Sıklıkla arızalı olan veya intraklonal çeşitlilikten yoksun, mutasyona uğramış, immünglobulin gen yeniden düzenlenmeleri içeren HRS hücreleri preapoptotik germinal merkez B hücrelerinden köken alıyor görünmektedir (32). Bcl-2 proteini matür lenfoid dokuda belirgin bölgelerde dağılım gösterir ve germinal merkezde yoktur (50). Zararlı veya arızalı mutasyona sahip germinal merkez B hücreleri genellikle apopitoz ile hızlıca elimine edildiği ve germinal merkez B hücrelerinde apopitoza neden olan zararlı mutasyonların sadece bir bölümü arızalı mutasyonlar olarak kolaylıkla tanınabildiğinden, HRS hücreleri kural olarak transforme edici bir olay tarafından kurtulmuş preapoptotik germinal merkez B hücrelerini temsil edebilir (33). KHL'de

t(14;18)'in rolünü ilgilendiren tartışmalı yayınlar vardır. Genel konsensus KHL'de t(14,18)'in olmadığıdır. Diğer önerilen mekanizmalar trisomi 18 ve kromozom 18q,der(18)'dir (30). Bizim çalışmamızda HRS hücrelerinde KHL olgularının %35'inde Bcl-2 pozitifliği izlendi. Bu oran önceden yayınlanan çalışmalardaki %30-%80 oranı ile uyuşuyordu. Oranlardaki bu geniş dağılımın Bcl-2 pozitifliğini değerlendirmede alınan farklı "cut-off" değerine bağlı olduğu düşünülmektedir (30).

Çalışmamızda da Bcl-2 ekspresyonu ile MHKHL ve NSKHL histolojik alt tipleri, yaş, cinsiyet ve evre ile arasında anlamlı ilişki bulunmadı. Ayrıca Bcl-2 ekspresyonu ile sağkalım arasında da anlamlı ilişki saptanmadı. Literatürde KHL'de Bcl-2 pozitifliğinin kötü prognostik faktör olarak kullanılabileceğini bildiren yayınlar vardır (51, 52). Bununla birlikte Spector ve ark'nın (4) Brezilya'daki KHL vakalarında yaptıkları çalışmada Bcl-2'nin klinik evre ve sağkalım ile arasında ilişki tespit etmediler. Wang ve ark.'larının (6) yaptığı çalışmada KHL farklı evrelerinde Bcl-2 ekspresyonunun anlamlı fark göstermediği ve NSKHL, MSKHL, ve LZKHL alt tipleri arasında korelasyon bulunmadığı bildirilmiştir. Ellidört pediatrik hasta ile yapılan başka bir çalışmada da Bcl-2'nin sağkalım, klinik evre ve histolojik alt tip ile ilişkisi bulunmadı (33). Ohsawa ve ark.'larının (5) çalışmasında KHL'de Bcl-2 ekspresyonu 33 vakadan 10 vakada pozitif idi. Görüldüğü gibi Bcl-2 ekspresyonunun KHL'de prognostik rolü hakkında net veriler bulunmamaktadır.

Literatürde Cox-2 ekspresyonu ile Bcl-2 ilişkisi incelendiğinde nonsteroidal anti-inflamatuar ilaçlar ile ilgili çalışmalar dikkati çekmektedir. NSAİİ'nin çeşitli kanser hücre serilerinde ve çeşitli kanserlerin hayvan modellerinde proliferasyonu inhibe etme ve apoptozu indüklemeye yetenekleri ile hastalıkları önleyici etkileri olduğu bildirilmiştir. Genel olarak Cox-2 inhibitörlerinin etkilerini direk Cox-2 inhibisyonu ile PG sentezini bloke etmek yoluyla gösterdiği anlaşılmıştır. Buna rağmen Cox-2 inhibitörlerinin kanser hücre proliferasyonunu yalnızca PG sentezini inhibe ederek gösterip göstermediği açığa kavuşmamıştır (13). İlginç bir şekilde en güçlü antineoplastik NSAİİ olan Celecoxib'in Cox-2 ekspresyonu için negatif olan hücre sistemlerinde de etkili olduğu belirginleşmektedir (48). Selektif Cox-2 inhibitörlerinin kolon (53), mide (54) ve prostatı (55) içeren çeşitli kanserlerde apoptozu indüklediği bildirilmiştir. Cox-2 inhibitörleri apoptozu Cox-2 bağımlı ve Cox-2 bağımsız yollar ile artırır; Cox-2 inhibitörleri Cox-2 ekspresyonu içermeyen

hücre serisinde apopitozu indükleyebilir (56). Cox-2 enzimi eksprese etmeyen tümör hücrelerinde Cox-2 inhibitörlerinin apopitozu indüklediği ve Cox-2 inhibitörlerinin apopitozu indükleyici etkisi için Cox-2 gerekmediği bildirilmiştir (46, 57). Nakamura ve ark.'larının (58) yaptığı çalışmada Cox-2 inhibitörü olan etodolac'ın lösemi ve myelom hücrelerinde apopitozu Cox-2 bağımsız ve Bcl-2 aracılı yol ile indüklediği bildirilmiştir. Kobayashi ve ark.'larının (13) yaptığı çalışmada, Cox-2 inhibitörlerinin lenfoma hücrelerine karşı etkili olduğu ve Cox-2 inhibitörlerinin lenfoma, lösemi ve myelom hücrelerinde Cox-2 bağımsız yol ile etki ettiği belirtilmiştir. Osteosarkom ile yapılmış başka bir çalışmada Celecoxib hücrelerde, Cox-2 ekspresyonunu downregüle etmemekte, fakat upregüle etmektedir (56). Cox-2 inhibitörü celecoxib anlamlı olarak hücre büyümesini inhibe eder ve inflamatuvar etki doz bağımlıdır (56). Prostat karsinomu ile yapılan bir çalışmada celecoxib'in tümör oluşumunu Cox-2 bağımsız mekanizmalar yoluyla azaltabileceği düşünülmüştür. Bunun da Cox-2 bağımsız mekanizmalar Akt aktivasyonunun inhibisyonu ile olabileceği belirtilmektedir (59). Multipl myelom vakaları ile yapılmış bir çalışmada Cox-2'nin sessizleştirilmesinin hücre proliferasyonunun inhibisyonuna ve Bcl-2 ailesinden bağımsız apopitozun indüklenmesine yol açtığı saptanmıştır. Bu çalışmada Cox-2'nin insan myeloma hücrelerinde hücre proliferasyonu ve apopitoz regülasyonunda rol oynadığı ve bunun Bcl-2 yolundan bağımsız olduğu bulunmuştur (49). Lev-Ari ve arkadaşlarının (60) kolon karsinomunda celecoxib etkisini inceleyen bir çalışmasında Cox-2 inhibisyonunun hücre büyümesi üzerine çok az etkisi olduğu, celecoxibin fizyolojik seviyelerde Cox-2 aktivitesini inhibe ettiği, apopitoz indüksiyonunu etkilemediğini gösterilmiştir. Anlamlı hücre büyümesini (>50%) indüklemek için istenen konsantrasyon, Cox-2 aktivitesini inhibe etmek için istenen seviyelerden (20 μ M) 4 kat fazla idi. Bunun gibi, büyüme inhibisyonu etkisinin muhtemelen PG E2 üretiminden bağımsız diğer yollardan kaynaklandığı sonucuna vardılar. Ayrıca fizyolojik seviyelerde celecoxib seviyesinin, hücre büyüme indüksiyonu ve apopitoz indüksiyonu üzerinde Cox-2 dışında yeni tanımlanan p27, β -catenin, Bcl-X, ve Bcl-2 gibi moleküler hedeflerin ve sinyal yolları serisi proteinlerinden hiçbirinin seviyesini değiştirmediği bildirilmiştir (60). Cox-2 inhibitörlerinin detaylı biyokimyasal mekanizmalarının hala anlaşılması zordur (48).

KHL ve EBV arasındaki ilişki son yıllarda yoğun olarak araştırılmaktadır. EBV'nin KHL patogenezinin dahil olabileceği önerisi infeksiyöz mononukleoz hikayesi olan hastalarda KHL'nin artmış riski ve KHL'li hastalarda EBV antijenlerine karşı artmış antikor titreleri ve değişmiş antikor paternleri gösteren epidemiyolojik ve serolojik çalışmalardan geldi (40). Vakaların belli bir bölümünde HRS hücrelerinde EBV genomlarının gösterilmesi hastalığın patogenezindeki rolü ile ilgili yeni önemli kanıtlar sağladı (4). Yakın zamandaki bilgilerde KHL için ana etyolojik ajan olan EBV latent genleri ve proteinlerin gelişmiş ülkelerdeki vakaların %26-52'sinde ve gelişmekte olan ülkelere %95'inde bildirilmiştir (40, 41, 61, 62). HRS hücrelerinde EBV saptanması temel olarak latent olarak ekspres edilen LMP-1 genine veya in situ hibridizasyon tekniği ile EBV'nin erken RNA transkriplerinin saptanmasına dayanır (41). HL ilişkili EBV'li hastalarda HRS hücreleri, yapısal olarak aktive tümör nekrotizan faktör (TNF) reseptörü olarak fonksiyon gören LMP-1'i yüksek seviyelerde ekspres eder (4). LMP-1'in birçok büyüme transforme edici etkisi nükleer faktör $\kappa\beta$ 'yi (NF κ B) içeren değişik sinyal yollarını aktive edebilme kabiliyetinden geldiği belirtilmektedir (4). KHL'li hastaların tümör hücresinde veya dokusunda EBV saptanması coğrafi lokalizasyon ve/veya saptanma metoduna göre değişir (40). Biz çalışmamızda immünohistokimyasal yöntemle LMP-1 antikorunu kullanarak 40 KHL'li vakanın 23'ünde (%57,5) HRS hücrelerinde EBV ilişkili LMP-1 saptadık. Bu prevalans, Avrupa ülkelerinde yayınlanan prevalansın hafifçe biraz üstündedir.

Çalışmamızda LMP-1 pozitifliği NSKHL ile karşılaştırıldığında MHKHL'de daha yüksek idi ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı farklı bulundu. Bu bulgu Avrupa topluluğu ve Amerika'daki EBV ile MHKHL alt tipi arasında güçlü ilişki bulunduğunu gösteren yayınlar ile uyumludur. Ancak tüm histolojik alt tiplerin EBV ile güçlü ilişkili olduğunu gösteren birçok gelişmekte olan ülkelere zıttır (40). Ayrıca LMP-1 prevalansı erkeklerde kadınlardan daha yüksek bulundu (sırasıyla %66,6, %38,5). Kadınların erkeklere göre daha az LMP-1 pozitifliği göstermesi önceki yayınlarda belirtildiği gibi kadın reproduktif sistemi ve KHL gelişimine karşı hormonların koruyucu rolü ile açıklanabilir. Diğer taraftan çalışmamızda MHKHL alt tipimiz büyük çoğunluğu oluşturmaktadır ve bu alt tipin diğer tiplere oranla etyolojik olarak daha fazla oranda EBV ile ilişki gösterdiği bilinmektedir.

KHL'de EBV durumu ve klinik evre arasındaki ilişkiyi ilgilendiren tartışmalı yayınlar vardır. Herling ve ark.'ları (71) LMP-1 ekspresyonu ile sağkalım ve 5 yıllık hastaliksız sağkalım arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulamadılar. Belçika'daki KHL vakaları ile yapılan bir çalışmada LMP-1 delesyonlarının varlığı ile histolojik alt tip, yaş, cinsiyet ve klinik evre arasında korelasyon bulunmadı. Aynı çalışma KHL vakalarının 1/3'ünde EBV varlığı, yaşlı hastalarda, erkek bireylerde ve MHKHL alt tipinde daha sık görüldüğü gösterildi (40). Bizim çalışmamızda LMP-1 ekspresyonu ile evre, yaş, cinsiyet arasında anlamlı ilişki bulunmadı, ayrıca sağkalım ile de anlamlı ilişki yoktu. Ancak histolojik alt tipler arasında LMP-1 ekspresyonu yönünden istatistiksel anlamlı farklılık bulundu. MHKHL'de daha fazla olguda LMP-1 pozitifliği vardı.

Literatürde KHL'de LMP-1 veya Epstein-Barr ile kodlanmış RNA (EBER) ekspresyonunun prognostik rolü ile ilgili tartışmalı yayınlar vardır. Murray ve ark.'ları (64) EBV tayini için EBER kullanarak sağkalım ile arasında anlamlı ilişki saptamamışlardır. Flavell ve ark.'ları (65) LMP-1 ekspresyonunun sadece erkeklerde ve 15-34 yaş grubu hastalarda hastaliksız sağkalım ile ilişkisini bildirmişlerdir. Ayrıca Morente ve ark.'larının (66) yaptığı çalışmada LMP-1'in tek değişkenli analizlerde değil, sadece çok değişkenli analizlerde anlamlı bir faktör olduğu bulunmuştur. Glavina-Durdov ve ark.'larının (67) yaptığı çalışmada da LMP-1 ekspresyonunun tüm hastalar için değil sadece genç hastalarda ve erken evre hastalarda sağkalım ile ilişkili olduğunu yayınlamışlardır. Başka yayınlarda da LMP-1 ile sağkalım arasında ilişki olmadığını bildirenler vardır (4, 63, 68). Bu çalışmalardaki istatistiksel testlerin ve değişkenlerin çeşitliliğinin, sonuçlardaki çeşitliliğe neden olabileceği söylenmektedir (4).

EBV ilişkili lenfomalardaki apoptoz düzenleyici genlerin ekspresyonunu gözönüne alan veriler arasında uyumsuzluk vardır. KHL'de HRS hücreleri, arızalı somatik mutasyonlar sonucu antijen tanıma yeteneğini kaybetmiş germinal merkez B hücrelerinden türer. Fizyolojik durumlarda bu arızalı hücreler apoptoza girer. Alternatif olarak, bunlar eşlik eden EBV enfeksiyonu ile apoptozdan kaçabilir. EBV apoptozu inhibe eden bazı proteinleri kodlar (31). EBV'nin, HRS hücrelerini apoptozdan kurtararak hücrelerinin transformasyonuna yol açtığı belirtilmektedir (41). Bu etki, B hücreler üzerinde LMP-1 in onkogenik potansiyeline bağlanmıştır.

LMP-1'in bunu B hücrelerinde Bcl-2'yi içeren antiapoptoz genlerini up-regüle etmesi (69), p16INK-4a down-regülasyonu (70) ve NFkB'nin aktivasyonu (71) yoluyla yaptığı bildirilmiştir. HRS hücrelerinde EBV'nin Bcl-2 ekspresyonunu indükleyebileceği ihtimali düşünülmüştür, çünkü LMP-1'in in-vitro hücre kültüründe Bcl-2 ekspresyonunu up-regüle ettiği gösterilmiştir (30). EBV'nin apoptozu sadece Bcl-2 yolu ile değil, diğer tanımlanmamış yollar ile de hedeflediği gösterilmiştir. Ayrıca EBV latent gen ürünleri altgrubu G2/M'de hücre siklusu kontrol noktalarını inaktive edebilir. Bcl-2 bu yola dahil değildir, çünkü bunun seviyesi apoptoz esnasında anlamlı olarak değişmez. Yakın zamanda siklinler ve siklin bağımlı kinazların bu yolda muhtemel adaylar olduğu belirtilmektedir (12). Çalışmaların bir kısmında EBV'nin KHL'de Bcl-2 up-regülasyonuna neden olmadığı bildirilirken (72, 73, 74, 75), Preciado ve ark.'nın (76) çalışmasında pediatrik KHL vakalarında Bcl-2 ve LMP-1 arasında istatistiksel olarak anlamlı ko-ekspresyon gösterilmiştir. Spector ve ark. da (4) Brezilya'daki KHL vakalarında yaptıkları çalışmada Bcl-2 ve LMP-1 arasında ve bunların klinik evre ve sağkalım ile arasında ilişki tespit etmediler. İki EBV ilişkili belirleyici olan LMP-1 ve EBER kullanan Wang ve ark.'larının (6) yaptığı çalışmada KHL farklı evrelerinde Bcl-2 ekspresyonu ve EBV belirleyicileri arasında anlamlı korelasyon bulunmadığı gibi, EBV belirleyicileri ile apoptoz, evre veya prognoz ile ilişkisi saptanmadı (6).

Çalışmamızda Bcl-2, Cox-2 ve LMP1 ekspresyonları arasında anlamlı ilişki bulunmadı. Ohsawa ve ark.'larının (5) çalışmasında KHL'de Bcl-2 ekspresyonu 33 vakadan 10 vakada pozitif idi ve Bcl-2 ekspresyonu Cox-2 pozitif grupta Cox-2 negatif gruba göre daha yüksek idi. Buna rağmen bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildi (5). Çalışmamızda LMP-1 ekspresyonu 40 vakadan 23'ünde (%57,5) pozitif saptandı. LMP-1 pozitif KHL vakalarının %65,2'sinde Bcl-2 ekspresyonu yoktu. Bu bulgu diğer anti-apoptotik proteinlerin EBV (+) HRS hücrelerinin sağkalımını sağladığını gösterebilir. Diğer taraftan EBV(-) KHL vakalarından %35,3'ü Bcl-2 ekspresse etti. Bu vakaların EBV için gerçekten negatif olduğunun in situ hibridizasyon ile doğrulanması gerekebilir. Bcl-2 hematolojik malignensi gelişiminde EBV'den bağımsız diğer mekanizmalar tarafından up-regüle edilebilir. Alternatif olarak, virüs taşıyıcı hücreler tümör ilerlemesi sırasında viral episome kaybı veya sitotoksik T hücreleri tarafından elimine edilebilir (30).

Özetle çalışmamızda KHL vakalarında histopatolojik parametreler incelenmiş ve immünohistokimyasal yöntemle Cox-2, Bcl-2 ve LMP-1 çalışılmıştır. Evrenin KHL'deki prognostik önemi tekrar doğrulanmıştır. Cox-2 ekspresyonu ile evre arasında anlamlı negatif korelasyon saptanmıştır. Ayrıca anlamlı olmamakla birlikte Cox-2 negatifliği yüksek evrede, Cox-2 pozitifliği de düşük evrede daha sık izlenmiştir. Diğer taraftan MHKHL'de NSKHL'e göre istatistiksel olarak daha fazla olguda Cox-2 negatifliği görülmüştür. Cox-2 ekspresyonu ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmış, Cox-2 negatifliğinin anlamlı kötü prognostik parametre olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda Cox-2 ekspresyonu ile Bcl-2 ve LMP-1 ekspresyonları arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. Bcl-2 ve LMP-1 ekspresyonları ile yaş, cinsiyet, evre ve sağkalım süreleri arasında anlamlı ilişki bulunmamış, sadece LMP-1 ekspresyonu MHKHL grubunda anlamlı olarak daha yüksek sıklıkta bulunmuştur. Evre, Cox-2, Bcl-2 ve LMP-1 ekspresyonlarını içeren Cox regresyon analizinde ise istatistiksel anlamlı bağımsız prognostik parametre saptanmamıştır. Daha fazla vakayı ve diğer alt tipleri de içeren KHL serileri ile sonuçların doğrulanmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca KHL vakalarında NSAİİ'lerin etkilerini inceleyen daha ileri çalışmalar yapılmalıdır. Çeşitli etkileşim halindeki onkogen yollarının kontrolünün kaldırılması sonucu oluşabilecek lenfoid karsinogenez kompleks bir olaydır. Bu onkogenlerden herhangi birinin normal fonksiyonu kaybetmesi neoplastik transformasyona yol açan ilk basamak olabilir ve bu diğer yollardaki yetersizliği başlatabilir. Bcl-2 ve LMP-1'in hastalık progresyonunda kullanışlı bir tahmin edici belirleyici olduğuna dair kanıtlar yoktur. Bcl-2, apoptozun intrensek yolağında fonksiyon gösterdiği için KHL'de apoptozun ekstrensek yolağına dahil Fas, Fas-ligand, TRADD veya NF-kB gibi diğer mekanizmaların rol oynayabileceği araştırmalar planlanabilir. Sonuç olarak çalışmamızda KHL'de evrenin prognostik değeri doğrulanmıştır. Bununla birlikte bulgularımız KHL'de ve MHKHL alt tipinde Cox-2 negatifliğinin kötü prognostik parametrelerden biri olabileceğini düşündürmektedir.

ÖZET

Hodgkin Lenfomada Cox-2, Bcl-2 ve LMP-1 Ekspresyonlarının İmmünohistokimyasal Yöntemle Araştırılması ve Prognoz ile İlişkilerinin İncelenmesi

Hodgkin lenfoma (HL) patogeneğinde Cox-2 ve Bcl-2'nin önemi net olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda Klasik HL'de (KHL) Cox-2, Bcl-2 ve LMP-1 ekspresyonları ile bunların klinikopatolojik parametreler ve prognoz ile ilişkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Çalışma 40 KHL (29 mikts hücreli (MH), 11 nodüler sklerozan (NS)) olgusu içerdi. Bu olgulara ait arşiv bloklarından doku mikroarrayleri hazırlandı ve immünohistokimyasal yöntemle Cox-2, Bcl-2 ve LMP-1 antikorları uygulandı. Olgulara ait klinik bilgiler arşiv dosyalarından elde edildi.

Çalışmamızda KHL alt tipleri arasında evre ve cinsiyet yönünden anlamlı farklılık saptandı. Yüksek evre olma (evre III-IV) oranı ile erkek cinsiyet oranı MHKHL alt tipinde NSKHL'ye göre anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla, $p=0.031$, $p<0.001$). Cox-2, 20 (%50) KHL olgusunda pozitif. Erkek cinsiyette Cox-2 negatifliği anlamlı olarak daha fazla bulundu ($p=0.041$). NSKHL'nin %81,8'i (9 olgu) ve MHKHL'nin %37,9'u (11 olgu) Cox-2 pozitifliği gösterdi ve bu istatistiksel olarak anlamlı farklıydı ($p=0.031$). Cox-2 ekspresyonu evre ile anlamlı negatif korelasyon gösterdi ($p=0.042$, $r=-0.328$). Bununla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da Cox-2 negatif olgular yüksek evreli grupta olma eğilimindeydiler. Bcl-2 ve LMP-1 sırasıyla 14 (%35) ve 23 (%57,5) KHL olgusunda pozitif. LMP-1 pozitifliği MHKHL alt tipinde (%75,9) anlamlı daha fazla saptandı ($p<0.001$). Kaplan Meier log rank analizinde yüksek evre (evre III-IV) ile Cox-2 negatifliği kötü prognostik parametreler olarak bulundu (sırasıyla, $p=0,004$, $p=0,010$). Ancak, Cox-2, Bcl-2, LMP-1 ekspresyonları ile evreyi içeren Cox regresyon analizinde anlamlı bağımsız prognostik parametre saptanmadı.

Sonuç olarak bu çalışmada KHL'de evrenin prognostik değeri doğrulanmıştır. Ayrıca bulgularımız Cox-2 negatifliğinin kötü prognostik parametrelerden biri olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: Hodgkin lenfoma, Cox-2, Bcl-2, LMP-1, prognoz

SUMMARY

The investigation of Cox-2, Bcl-2 and LMP-1 expressions by immunohistochemistry in Hodgkin's Lymphoma and their relation with prognosis

The importance of Cox-2 and Bcl-2 in the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma (HL) is not known exactly. The aim of this study is to examine Cox-2, Bcl-2 and LMP-1 expressions immunohistochemically in HL and to investigate their relation with clinicopathologic parameters and prognosis.

The study included 40 classical Hodgkin's lymphoma (CHL) (29 mixed cellularity (MC), 11 nodular sclerosis (NS)). Cox-2, Bcl-2 and LMP-1 antibodies were performed to tissue microarrays immunohistochemically. Clinical data of the cases were obtained from the medical files.

In this study, the advance stage (stage III-IV) and male gender were significantly higher in MCCHL in contrast to NSCHL ($p=0.031$, $p<0.001$, respectively). Cox-2 were positive in 20 cases (50%) of CHL. Male gender had significantly more Cox-2 negativity ($p=0.041$). 81,8% of NSCHL and 37,9% of MCCHL were Cox-2 positive, which was significantly different ($p=0.031$). There was a negative correlation between Cox-2 expression and clinical stage ($p=0.042$, $r=-0.328$). However, Cox-2 negative cases tend to be higher in advance stage, although it was not significant. Bcl-2 and LMP-1 were positive in 14 (35%) and 23 (57,5%) in CHL, respectively. LMP-1 positivity was significantly higher in MCCHL subtype (75,9) ($p<0.001$). By Kaplan Meier log rank test, advance stage and Cox-2 negativity were found as poor prognostic parameters for survival ($p=0,004$, $p=0,010$, respectively). However, significant independent prognostic parameter was not found by Cox regression analysis.

In conclusion, our study confirm the prognostic value of clinical stage in CHL. Our results also suggest that Cox-2 negativity may be one of the poor prognostic parameters.

Key words: Hodgkin's lymphoma, Cox-2, Bcl-2, LMP-1, prognosis

KAYNAKLAR

1. Bayerl MG, Bentley G, Bellan C, Leoncini L, Ehmann WC, Palutke M. Lacunar and reed-sternberg-like cells in follicular lymphomas are clonally related to the centrocytic and centroblastic cells as demonstrated by laser capture microdissection. *Am J Clin Pathol* 2004; 122:858-864.
2. Türeci O, Schmitt H, Fadle N, Pfreundschuh M, Sahin U. Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease. *J Biol Chem* 1997; 272(10):6416-22.
3. Tzankov A, Zimpfer A, Went P, Maurer R, Pileri SA, Geley S, Dirnhofer S. Aberrant expression of cell cycle regulators in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma. *Mod Pathol* 2005; 18(1):90-6.
4. Spector N, Milito CB, Biasoli I, Luiz RR, Pulcheri W, Morais JC. The prognostic value of the expression of BCL-2, p53 and LMP-1 in patients with Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2005; 46(9):1301-6.
5. Ohsawa M, Fukushima H, Ikura Y, Inoue T, Shirai N, Sugama Y, Suekane T, Kitabayashi C, Nakamae H, Hino M, Ueda M. Expression of cyclooxygenase-2 in Hodgkin's lymphoma: its role in cell proliferation and angiogenesis. *Leuk Lymphoma* 2006; 47(9):1863-71.
6. Wang J, Taylor CR. Apoptosis and cell cycle-related genes and proteins in classical Hodgkin lymphoma: application of tissue microarray technique. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003; 11(3):206-13.
7. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Philadelphia: 9 th Ed. Mosby, 2004; p.:1917-1930
8. Schnitzer B. Hodgkin Lymphoma. Hsi ED. *Hematopathology* Philadelphia. Churchill Livingstone Elsevier, 2007; p.:333-364
9. Stein HS, Hummel M. Hodgkin's disease: biology and origin of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Cancer Treat Rev* 1999; 25(3):161-8.
10. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: 4 th Ed. IARC, 2008; p.:323-334.
11. Aster JC. Disease of White Blood Cells, Lymph Nodes, Spleen, and Thymus. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: 7 th Ed. Elsevier Saunders, 2005; p.:686-690
12. Bahnassy AA, Zekri AR, Asaad N, El-Houssini S, Khalid HM, Sedky LM, Mokhtar NM. Epstein-Barr viral infection in extranodal lymphoma of the head and neck: correlation with prognosis and response to treatment. *Histopathology* 2006; 48(5):516-28.
13. Kobayashi M, Nakamura S, Shibata K, Sahara N, Shigeno K, Shinjo K, Naito K, Ohnishi K. Etodolac inhibits EBER expression and induces BCL-2-regulated apoptosis in Burkitt's lymphoma cells. *Eur J Haematol* 2005; 75: 212-220.
14. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107:1183 – 1188.
15. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B. The effect of celeCOXib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000; 342(26):1946-52.
16. Saukkonen K, Rintahaka J, Sivula A, Buskens CJ, Van Rees BP, Rio MC, Haglund C, Van Lanschot JJ, Offerhaus GJ, Ristimaki A. Cyclooxygenase-2 and gastric carcinogenesis. *APMIS* 2003; 111(10):915-25.
17. Van Rees BP, Saukkonen K, Ristimaki A, Polkowski W, Tytgat GN, Drillenburger P, Offerhaus GJ. Cyclooxygenase-2 expression during carcinogenesis in the human stomach. *J Pathol* 2002; 196(2):171-9.
18. Wun T, McKnight H, Tuscano JM. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2): a potential role in the pathogenesis of lymphoma. *Leuk Res* 2006; 80(3):1321-31.
19. Hazar B, Ergin M, Seyrek E, Erdoğan Ş, Tuncer İ, Hakverdi S. Cyclooxygenase-2 (COX-2) Expression in Lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2004; 45(7):1395-9.

20. Paydas S, Ergin M, Erdoğan S, Seydaoglu G. Cyclooxygenase-2 expression in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2007; 48(2):389-95.
21. Shim SJ, Yang WI, Shin E, Koom WS, Kim YB, Cho JH, Suh CO, Kim JH, Kim GE. Clinical significance of cyclooxygenase-2 expression in extranodal natural killer (NK)/T-cell lymphoma, nasal type. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 67(1):31-8.
22. Hsu S, Hsu P, Lo S, Wu K. Expression of prostaglandin H synthase (cyclooxygenase) in Hodgkin's mononuclear and Reed-Sternberg cells. Functional resemblance between H-RS cells and histiocytes or interdigitating reticulum cells. *Am J Pathol* 1988; 133(1):5-12.
23. Savard M, Belanger C, Tremblay MJ, Dumais N, Flamand L, Borgeat P, Gosselin J. EBV Suppresses Prostaglandin E2 Biosynthesis in Human Monocytes. *J Immunol* 2000; 164:6467-6473.
24. Shelby BD, Nelson A, Morris C. γ -Herpesvirus Neoplasia: A Growing Role for COX-2. *Microsc Res Tech* 2005; 68(3-4):120-9.
25. Lin DW, Nelson PS. The role of cyclooxygenase-2 inhibition for the prevention and treatment of prostate carcinoma. *Clin Prostate Cancer* 2003; 2:119-126.
26. Li XH, Li JJ, Zhang HW, Sun P, Zhang YL, Cai SH, Ren XD. Nimesulide inhibits tumor growth in mice implanted hepatoma: overexpression of Bax over BCL-2. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24:1045-1050.
27. Cheng AS, Chan HL, Leung WK, Wong N, Johnson PJ, Sung JJ. Specific COX-2 inhibitor, NS-398, suppresses cellular proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol* 2003; 23:113-119.
28. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and BCL-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58: 362 - 366.
29. Sun Y, Tang XM, Half E, Kuo MT, Sinicropo FA. Cyclooxygenase-2 overexpression reduces apoptotic susceptibility by inhibiting the cytochrome c-dependent apoptotic pathway in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62: 6323 - 6328.
30. Kim LH, Nadarajah VS, Peh SC, Poppema S. Expression of BCL-2 family members and presence of Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death in classical Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 2004; 44:257-267.
31. Hussein MR, Al-Sabae TM, Georgis MN. Analysis of the BCL-2 and p53 protein expression in the lymphoproliferative lesions in the upper Egypt. *Cancer Biol Ther* 2005; 4(3):324-8.
32. Brauninger A, Wacker H, Rajewsky K, et al. Typing the histogenetic origin of the tumor cells of lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma in relation to tumor cells of classical and lymphocyte predominance Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 2003; 63:1644-1651.
33. Chabay P, Pesce P, De Matteo E, Lombardi MG, Rey G, Preciado MV. No Influence of BCL-2, p53, and p21waf1 protein expression on the outcome of pediatric Hodgkin lymphomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 2006; 28:552-558
34. Bayerl MG, Bentley G, Bellan C, Leoncini L, Ehmann WC, Palutke M. Lacunar and reed-sternberg-like cells in follicular lymphomas are clonally related to the centrocytic and centroblastic cells as demonstrated by laser capture microdissection. *Am J Clin Pathol* 2004; 122:858-864.
35. Lu JJ, Chen CL, Hsu TY, Chen JY, Su IJ, Yu WC, Yang CS. Expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and Bcell leukemia-lymphoma 2 gene in nasopharyngeal carcinoma tissues. *J Microbiol Immunol Infect* 2002; 35:136-140.
36. Xiong A, Clarke-Katzenberg RH, Valenzuela G, Izumi KM, Millan MT. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activates nuclear factor- κ B in human endothelial cells and inhibits apoptosis. *Transplantation* 2004; 78:41-49.
37. Zhang X, Hu L, Fadeel B, Ernberg IT. Apoptosis modulation of Epstein-barr virus-encoded latent membrane protein 1 in the epithelial cell line HeLa is stimulus-dependent. *Virology* 2002; 304:330-341.
38. Bellows DS, Howell M, Pearson C, Hazlewood SA, Hardwick JM. Epstein-Barr virus BALF1 is a BCL-2-like antagonist of the herpesvirus antiapoptotic BCL-2 proteins. *J Virol* 2002; 76:2469-2479.
39. Nicholls J, Kremmer E, Meseda CA, Mackett M, Hahn P, Gulley ML, Brink A, Swinnen LJ, Greenspan J, De Souza Y, Grasser F, Sham J, Ng MH, Arrand JR. Comparative analysis of the expression of the Epstein-Barr virus (EBV) anti-apoptotic gene BHRF1 in nasopharyngeal carcinoma and EBV-related lymphoid diseases. *J Med Virol* 2001; 65:105-113.

40. Trimeche M, Bonnet C, Korbi S, Boniver J, Leval LD. Association between Epstein-Barr virus and Hodgkin's lymphoma in Belgium: A pathological and virological study. *Leuk Lymphoma* 2007; 48(7): 1323 – 1331.
41. Abd El All HS. Bob-1 is expressed in classic Hodgkin lymphoma. *Diagn Pathol* 2007; 8(2):10.
42. Kaul R, Verma SC, Murakami M, Choudhuri T, Robertson ES. Epstein-Barr virus protein can upregulate cyclo-oxygenase-2 expression through association with the suppressor of metastasis Nm23-H1. *J Virol* 2006; 80(3):1321-31.
43. Phipps RP, Ryan E, Bernstein SH. Inhibition of cyclooxygenase-2: a new targeted therapy for B-cell lymphoma? *Leuk Res* 2004; 28(2):109-11.
44. Shattuck-Brandt RL, Varilek GW, Radhika A, Yang F, Washington MK, DuBois RN. Cyclooxygenase 2 expression is increased in the stroma of colon carcinomas from IL-10(-/-) mice. *Gastroenterology* 2000; 118:337–345.
45. Schuller HM, Plummer III HK, Bochsier PN, Dudrick P, Bell JL, Harris RE. Co-expression of β -adrenergic receptors and cyclooxygenase-2 in pulmonary adenocarcinoma. *Int J Oncol* 2001; 19:445 – 449
46. Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 2002; 62(6):1676-81.
47. Crowell PL, Schmidt CM, Yip-Schneider MT, Savage JJ, Hertzler DA 2nd, Cummings WO. Cyclooxygenase-2 expression in hamster and human pancreatic neoplasia. *Neoplasia* 2006; 8(6):437-45.
48. Jendrossek V, Handrick R, Belka C. CeleCOXib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway. *FASEB J* 2003; 17(11):1547-9.
49. Li QB, Chen ZC, You Y, Zou P. Small interfering RNA of cyclooxygenase-2 induces growth inhibition and apoptosis independently of BCL-2 in human RPMI8226 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28 (7): 1031–1036
50. Korsmeyer S. BCL-2 Initiates a new category of oncogenes:regulators of cell death. *Blood* 1992; 80:879–886.
51. Brink AA, Oudejans JJ, van den Brule AJ, et al. Low p53 and high BCL-2 expression in Reed-Sternberg cells predicts poor clinical outcome for Hodgkin's disease: involvement of apoptosis resistance? *Mod Pathol* 1998; 11:376–383.
52. Sup SJ, Alemany CA, Pohlman B, et al. Expression of BCL-2 in classical Hodgkin's lymphoma: an independent predictor of poor outcome. *J Clin Oncol* 2005; 23:3773–3779
53. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and BCL-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58:362–366.
54. Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of gastric cancer xenografts via induction of apoptosis in nude mice. *Am J Physiol* 1998; 274:1061–1067.
55. Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates BCL-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* 1998; 58:4245–4249.
56. Liu B, Shi ZL, Feng J, Tao HM. CeleCOXib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in human osteosarcoma cell line MG-63 via down-regulation of PI3K/Akt. *Cell Biol Int*. 2008; 32(5):494-501.
57. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995; 83:493–501.
58. Nakamura S, Kobayashi M, Shibata K et al. COX-2 independent induction of apoptosis by etodolac in leukemia cells in vitro and growth inhibition of leukemia cells in vivo. *Cancer Ther* 2004; 2:153–166.
59. Kulp SK, Yang YT, Hung CC, Chen KF, Lai JP, Tseng PH, Fowble JW, Ward PJ, Chen CS. 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1/Akt Signaling Represents a Major Cyclooxygenase-2-Independent Target for CeleCOXib in Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* 2004; 64(4):1444-51.
60. Lev-Ari S, Kazanov D, Liberman E, Ben-Yosef R, Arber N. Down-Regulation of PGE2 by Physiologic Levels of CeleCOXib is not Sufficient to Induce Apoptosis or Inhibit Cell Proliferation in Human Colon Carcinoma Cell Lines. *Dig Dis Sci* 2007; 52(4):1128-33.
61. Weinreb M, Day PJ, Niggli F, et al. The role of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease from different geographical areas. *Arch Dis Child* 1996; 74:27–31.
62. Herbst H, Steinbrecher E, Niedobitek G, et al. Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-harboring cells in Hodgkin's disease. *Blood* 1992; 80:484–91.

63. Herling M, Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Vassilakopoulos TP, Kliche KO, Nadali G, Vivani S, Bonfante V, Giardini R, Chilosi M, et al. Expression of Epstein – Barr virus latent membrane protein-1 in Hodgkin and Reed – Sternberg cells of classical Hodgkin’s lymphoma: associations with presenting features, serum interleukin 10 levels, and clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2114 – 2120.
64. Murray PG, Billingham LJ, Hassen HT, Flavell JR, Nelson PN, Scott K, et al. Effect of Epstein-Barr virus infection on response to chemotherapy and sağkalımval in Hodgkin’s disease. *Blood* 1999; 94:442 – 447.
65. Flavell KJ, Billingham LJ, Biddulph JP, Gray L, Flavell JR, Constandinou CM, Young LS, Murray PG. The effect of Epstein – Barr virus status on outcome in age- and sex-defined subgroups of patients with advanced Hodgkin’s disease. *Ann Oncol* 2003; 14:282 – 290.
66. Morente MM, Piris MA, Abaira V, Acevedo A, Aguilera B, Bellas C, Fraga M, Garcia-Del-Moral R, Gomez-Marcos F, Menarguez J, et al. Adverse clinical outcome in Hodgkin’s disease is associated with loss of retinoblastoma protein expression, high Ki67 proliferation index, and absence of Epstein – Barr virus-latent membrane protein 1 expression. *Blood* 1997; 90:2429 – 2436.
67. Glavina-Durdov M, Jakic-Razumovic J, Capkun V, Murray P. Assessment of the prognostic impact of the Epstein – Barr virus-encoded latent membrane protein-1 expression in Hodgkin’s disease. *Br J Cancer* 2001; 84:1227 – 1234.
68. Axdorph U, Porwit-MacDonald A, Sjoberg J, Grimfors G, Eckman M, Wang W, Biberfeld P, Bjorkholm M. Epstein–Barr virus expression in Hodgkin’s disease in relation to patient characteristics, serum factors and blood lymphocyte function. *Br J Cancer* 1999; 81:1182 – 1187
69. Rowe M, Peng-Pilon M, Huen DS, Hardy R, Croom-Carter D, Lundgren E, Rickinson AB: Upregulation of BCL-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kappa B activation and to induction of cell surface markers. *J Virol* 1994; 68:5602-5612.
70. Yang X, He Z, Xin B, Cao L: LMP1 of Epstein-Barr virus suppresses cellular senescence associated with the inhibition of p16INK4a expression. *Oncogene* 2000; 19:2002-2013.
71. Izumi KM, Kieff ED: The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-κB. *PNAS* 1997; 94:12592-12597.
72. Khan G, Gupta RK, Coates PJ, Slavin G. Epstein–Barr virus infection and BCL-2 proto-oncogene expression: separate events in the pathogenesis of Hodgkin’s disease? *Am J Pathol* 1993; 143:1270–1274.
73. Jiwa NM, Oudejans JJ, Bai MC et al. Expression of BCL-2 protein and transcription of the Epstein–Barr virus BCL-2 homologue BHRF-1 in Hodgkin’s disease: implications for different pathogenic mechanisms. *Histopathology* 1995; 26:547–553.
74. Jiwa NM, Kanavaros P, van der Valk P et al. Expression of c-myc and BCL-2 oncogene products in Reed–Sternberg cells independent of presence of Epstein–Barr virus. *J Clin Pathol* 1993; 46: 211–217.
75. Lauritzen AF, Moller PH, Nedergaard T et al. Apoptosis-related genes and proteins in Hodgkin’s disease. *APMIS* 1999; 107:636–644.
76. Preciado MV, Cristobal E, Menarguez J et al. Oncogene expression in tumour cells of paediatric Hodgkin’s disease in Argentina—correlation with Epstein–Barr virus presence. *Pathol Res Pract* 1998; 194:25–31.