

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

KAPOSI SARKOMU VE DİĞER VASKÜLER LEZYONLARDA VEGFR-3
EKSPRESYONU İLE HHV8 VARLIĞININ İMMÜNHİSTOKİMYASAL VE İN-SİTU
HİBRİDİZASYON YÖNTEMLERİYLE ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ebru KARAYİĞİT

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nesimi Büyükbabani

İSTANBUL 2007

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Anabilim Dalı Başkanımız Sn. Prof. Dr. Mehmet AĞAN başta olmak üzere tüm değerli öğretim üyelerine, tezimin her aşamasında bana yol gösteren ve destek olan tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Nesimi BÜYÜKBABANI'ye, tezimin ön hazırlığında ve teknik aşamalarında yardımcı olan Sn. Prof. Dr. Öner DOĞAN'a, yardımları ve desteği için Sn. Uzm. Dr. Yasemin ÖZLÜK ve Sn. Uzm. Dr. Özgür METE'ye, istatistiksel değerlendirmede yardımcı olan Sn. Nurten DAYIOĞLU'na, tezimin teknik aşamasının hazırlanması ve uygulanmasında yardımcı olan Sn. Hatice ÖĞÜT'e, Sn. Jülide HOCAOĞLU'na, Sn. Fatma AY'a ve çalışma arkadaşlarım ile her zaman beni destekleyen aileme ve tez çalışmam süresince yanımda olan canım anneme teşekkürlerimle...

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1-2
GENEL BİLGİLER	3-26
I-Kaposi Sarkomunun Tarihçesi	3-4
II-Kaposi Sarkomunda Epidemiyoloji, Etyoloji ve Patogenez	4-16
Epidemiyoloji	4-7
Etyoloji ve Patogenez	7-16
III-Kaposi Sarkomunda Hücre Kökeni	16-17
IV-Kaposi Sarkomunda Klinik Bulgular	17-19
V-Kaposi Sarkomunda Histopatoloji	20-21
VI-Kaposi Sarkomunda Ayırıcı Tanı	21-23
VII-Kaposi Sarkomunda Tedavi	24-26
ÇALIŞMADA KULLANILAN BELİRLEYİCİLER ve İN-SİTU HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ	
HAKKINDA GENEL BİLGİLER	27-30
HHV8 LNA-1 (Human Herpesvirus Type 8 Latent Nuclear Antigen-1)	27
VEGFR-3 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3)	28-29
İn-Situ Hibridizasyon	29-30
MATERYEL METOD	31-38
BULGULAR	39-48
TARTIŞMA	49-65
SONUÇLAR	66-68
ÖZET	69
RESİMLER	70-75
KAYNAKLAR	76-86

KISALTMALAR

BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
bFGF	Basic fibroblast growth factor
bp	Baz çifti
cFLIP	Cellular Fas-ligand-interleukin 2-converting enzyme [FLICE] inhibitor protein
EBNA	EBV nükleer antijen
EBV	Epstein Barr virus
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
GMCSF	Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor
HAART	Highly active antiretroviral therapy
hCG	Human chorionic gonadotropin
HHV8	Human herpes virus
HIV	Human immunodeficiency virus
HVS	Simian herpesvirus saimiri
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFA	Immunofluorescence assay
IFN	İnterferon
Ig	İmmünglobulin
IL	İnterlökin
IRF	İnterferon regulatory factor
KLL	Kronik lenfositik lösemi
KSHV	Kaposi sarcoma associated herpesvirus
LANA -1	Latency associated nuclear antigen-1
LCA	Leukocyte common antigen
LMP1	Latent membrane protein 1
LNA-1	Latent nuclear antijen-1
LUR	Long unique region
MAC387	Monocyte/macrophage associated antigen
MCP	Monocyte chemotactic protein
MHC	Major histocompatibility complex
MIP	Macrophage inflammatory protein
MMP	Matrix metalloproteinase
NBT	Nitroblue tetrazolium
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF- β	Platelet derived growth factor- β
PEL	Primer efüzyon lenfoması
PF-8	Processivity factor-8
pRb	Retinoblastom proteini
Rta	Replication and transcription activator
STP	Simian transforming protein
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF	Tümör nekroz faktörü
TRs	Terminal repeat sequences
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR-3	Vascular endothelial growth factor receptor type-3
vGPCR	Viral G protein coupled receptor
vIRF	Viral interferon regulatory factor
VMIPs	Viral macrophage inflammatory proteins

GİRİŞ VE AMAÇ

Kaposi sarkomu, kan damarları ve lenfatiklerin multifaktöriyel kökenli mezenkimal bir tümördür. Kaposi sarcoma associated herpesvirus (KSHV) veya human herpesvirus (HHV8) olarak tanımlanan virüse bağlı onkojenik etki, bazı durumlara bağlı immünsüpresyon (HIV [human immunodeficiency virus] enfeksiyonu, iyatrojenik) ve sitokinler, Kaposi sarkomu gelişiminde önemli faktörlerdir (1).

Kaposi sarkomunun farklı klinik ve epidemiyolojik tipleri tanımlanmıştır. Bunlar klasik (Akdeniz), endemik (Afrika), transplantasyon veya iyatrojenik immünsüpresyon ile birlikte görülen ve AIDS-asosiyel (epidemik) tiplerdir. Kaposi sarkomu deri lezyonları, klinik olarak birbirini izleyen, bazen birlikte bulunabilen, çok sayıda, birbirinden bağımsız makül/yama (patch), plak ve nodüller şeklinde olabilmektedir (2, 3).

Kaposi sarkomu etyolojisi, tüm klinik ve epidemiyolojik tiplerinde yıllardır sorgulanmaktadır. Kaposi sarkomunun tüm tiplerinde Kaposi sarcoma associated herpesvirus/human herpesvirus 8 olarak tanımlanan enfeksiyöz bir kofaktörün bulunması, Kaposi sarkomu gelişiminin engellenmesi ve tedavisine yönelik çok sayıda yeni araştırmaya konu olmuştur (4).

Morfolojik spektrumunun geniş olması, benign veya malign vasküler tümörler ve vasküler kökenli olmayan iğsi hücreli yumuşak doku tümörlerini taklit etmesi nedeniyle, Kaposi sarkomunun histopatolojik tanısı bazen problemlidir (5, 6). Histopatolojik tanının zor olduğu, iğsi hücre komponentinin belirgin olarak görülmediği makül/yama ve plak evresinde tanıya yardımcı olması ve Kaposi sarkomu ayırıcı tanısına girebilecek vasküler lezyonlardan ayırırda HHV8 latent nükleer antijen-1 (LNA-1) ekspresyonunun yararlı olduğu bildirilmektedir (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

Kaposi sarkomunda proliferen olan ve lezyonu oluşturan hücrelerin kökeni tartışma konusudur. Kaposi sarkomunda iğsi hücrelerin kökenine yönelik VEGFR-3 (vascular endothelial growth factor receptor type 3) ve podoplanin gibi lenfatik endotele özgü antikolar ile yapılan çalışmalarda, lenfatik kökeni destekleyen bulgular bildirilmektedir (10, 12).

Bu çalışmanın amacı, Kaposi sarkomu ve Kaposi sarkomu ile histopatolojik ayırıcı tanıya girebilecek benign vasküler proliferatif lezyonlar ile iğsi hücre komponenti olan diğer benign ve malign vasküler tümörlerde HHV8 varlığını immünhistokimya ve in-situ hibridizasyon olmak üzere iki farklı yöntemle araştırmak, HHV8 varlığının Kaposi

sarkomuna özgül olup olmadığı ve bunun tanıya yardımcı olup olmayacağını belirlemektir. Ayrıca Kaposi sarkomu vakalarında HHV8 dağılımında immünohistokimyasal yöntem ile in-situ hibridizasyon arasında bir farklılık olup olmadığı ve bu yöntemlerden hangisinin Kaposi sarkomu tanısı için rutin çalışmada daha uygun olduğunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Diğer yandan Kaposi sarkomu ve diğer vasküler lezyonlarda lenfatik endotele özgü VEGFR-3 ekspresyonu arasında anlamlı fark olup olmadığı araştırılarak, Kaposi sarkomu hücrelerinin kökeni hakkında bir çıkarımda bulunulmaya çalışılacaktır.

GENEL BİLGİLER

I-KAPOSİ SARKOMUNUN TARİHÇESİ

Kaposi sarkomu ilk olarak 1872 yılında Macar dermatolog Moritz Kaposi (1837-1902) tarafından “derinin idiyopatik multipl pigmente sarkomu” adıyla tanımlanmıştır (13). Kaposi, hastalarında deri dışında larenks, trakea, mide, karaciğer ve kolon mukozasında da benzer neoplaziler gözlemlemiştir (14). Kaposi'nin 1872 yılındaki orijinal tanımlamasındaki 5 hastanın 2-3 yıl içinde ölmesi nedeniyle bu hastaların, İtalyan, Musevi veya Akdeniz havzasında yaşlı erkeklerde izlenen benign seyirli klasik (Akdeniz) Kaposi sarkomundan çok, AIDS-asosiyeye (epidemik) Kaposi sarkomu vakalarına benzediği ileri sürülmüştür (14, 15).

Genellikle Orta ve Doğu Afrika ülkelerinde görülen, tüm malign hastalıkların %10'unu oluşturan endemik (Afrika) Kaposi sarkomu 1950'li yıllarda tanımlanmıştır (16, 17, 18).

1960 ve 70'li yıllarda organ transplantasyonu çağının başlamasını izleyerek immünsüprese hastalarda, transplantasyon veya iyatrojenik immünsüpresyon ile birlikte görülen Kaposi sarkomu tanımlanmıştır (4, 19, 20).

Yirminci yüzyılın başlarında Kaposi sarkomu, yavaş seyirli bir neoplazi olarak bilinmekteydi ve hastaların Kaposi sarkomundan ziyade, bu hastalık ile birlikte ölmeleri beklenirdi (14). İlk kez Kaposi tarafından farkedilen agresif seyir, özellikle homoseksüel erkeklerde olmak üzere, AIDS hastalığının neden olduğu yıkımın bir parçası haline gelmiştir.

1981 yılında New York ve San Francisco'da homoseksüel erkeklerde Pneumocystis carinii infeksiyonları ve Kaposi sarkomunun tanımlanması ile AIDS'li hastalarda, AIDS-asosiyeye (epidemik) Kaposi sarkomu gelişimine işaret edilmiştir (14, 21, 22, 23). 1980'li yıllarda HIV pandemisi ile Kaposi sarkomu insidensinin artışı takiben yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, Batı ülkelerinde en çok homoseksüel erkeklerde, seksüel yolla yayılan bir ajan ile ilişkili olduğu yönünde kanıtlar ortaya çıkmaya başlamıştır (24).

Transplantasyon veya AIDS ile ilişkili Kaposi sarkomu vakalarında bağışıklık durumunun düzeltilmesinin lezyonların gerilemesine neden olduğunun klinik olarak gözlenmesi, bu vasküler proliferasyonun gerçekten tümöral karakterli olup olmadığı konusunda kuşkuvarın güçlenmesine neden olmuş, hastalığın immünolojik ve virolojik zemini araştırmaların odaklandığı nokta haline gelmiştir.

Bu çabalar sonucunda 1994 yılında Chang ve ark. tarafından AIDS-asosiyeye Kaposi sarkomlu bir hastada Kaposi sarkomu lezyonunda, lezyon dışı dokularda bulunmayan ve gamma herpesvirüslerle %30-50 benzerlik gösteren, Kaposi sarcoma associated herpesvirus veya human herpesvirus 8 olarak adlandırılan virüse ait iki DNA sekansının (KS330Bam ve KS631Bam) tanımlanması ile büyük bir adım atılmıştır (25).

II-KAPOSİ SARKOMUNDA EPİDEMİYOLOJİ, ETYOLOJİ VE PATOGENEZ

Epidemiyoloji

Kaposi sarkomu, Avrupa ve Amerika'da HIV ile infekte popülasyon dışında nadiren görülür (26). AIDS pandemisinden önce, Kaposi sarkomu özellikle İtalya, Yunanistan ve Orta Doğu gibi Akdeniz ülkeleri ile birkaç Afrika ülkesinde endemik olarak görülmekteydi (1).

KSHV/HHV8 infeksiyon oranları, Kaposi sarkomu insidensi ile paralellik göstermektedir. Amerika, Avrupa ve Asya'nın bir çok yerinde düşük oranlarda olan seroprevalans, Akdeniz ülkelerinde artarak, Uganda, Zambiya ve Güney Afrika'da en yüksek oranlara ulaşır (27). Kuzey Amerika, Kuzey Avrupa ve Asya'da %0-5 olan seroprevalans oranı, Akdeniz ve Orta Doğu'da %5-20, Afrika'da ise %50'nin üzerindedir (28).

KSHV/HHV8 seroprevalansının yüksek olduğu Afrika, İtalya, Akdeniz ülkeleri ve Doğu Avrupa'da Kaposi sarkomu insidensi de yüksektir. Düşük seroprevalans oranlarının saptandığı Hindistan, Tayland, Malezya ve Sri Lanka gibi Güneydoğu Asya ülkelerinde Kaposi sarkomu ve KSHV/HHV8 ile ilişkili hastalıklar yoktur. Bu bölgelerde özellikle HIV ile infekte popülasyonda düşük seroprevalans oranları saptanmıştır. Bu bulgu, virüsün bu bölgelerde yeni olduğunu ve KSHV/HHV8 infekte bireylerin hastalık gelişimi için risk altında olduğunu düşündürmektedir. Bir başka varsayım, Kaposi sarkomu gelişimi için KSHV/HHV8 dışında bir faktörün gerekli olması ve bunun Güneydoğu Asya'da bulunmaması olabilir (29).

Çin'in kuzeybatısındaki Xinjiang'da Kaposi sarkomu olmayan Uygur'lu hastalarda KSHV/HHV8 seropozitifliği %46 düzeyinde olup, Kaposi sarkomunun endemik olduğu Afrika'ya yakın orandadır. Bu yüksek oranın, Xinjiang'ın Roma'dan Çin'e uzanan ipek yolu üzerinde olması ve virüsün sirkülasyonu ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (30).

Dünyanın büyük bölümünde genel popülasyonda virüs bulunmadığından ve kan transfüzyonu veya organ transplantasyonu sonucu bulaşan KSHV/HHV8 infeksiyonuna bağlı olarak hastalık gelişim riski kanıtlanmış olduğundan, donör kanlarının, şu anda HIV ve HTLV için yapıldığı gibi, KSHV/HHV8 varlığı açısından taranması gerektiği önerilmiştir (29).

KSHV/HHV8 bulaşma yolları prevalans paternini yansıtmaktadır (29). KSHV/HHV8'in bulaşmasında seksüel yolun önemli olduğu düşünölmekle birlikte, AIDS gelişimi öncesinde Afrika'da çocuklarda görölmesi ile özellikle anneden fetusa (31), aile içi ve horizontal yayılım gibi başka bulaş yollarının olduğu düşünölmüştür.

Seroepidemiyojik çalışmalarda endemik Kaposi sarkomu, Amerikalı AIDS-asosiyel Kaposi sarkomu, Amerikalı HIV-seropozitif homoseksüel erkek, HIV-seropozitif uyuşturucu kullanan, HIV-seropozitif kadınlarda sırasıyla %100, %96, %90, %23, %21 KSHV/HHV8 seropozitifliği yanısıra, Amerika genel popölasyonunda yetişkinlerde %25, çocuklarda %2-8 KSHV/HHV8 seropozitifliği saptanması, bu virüsün seksüel yol dışında başka bulaş yolları olduğunu desteklemektedir (32).

Küçük çocuklarda KSHV/HHV8 seroprevalansının düşük olması hamilelik, doğum ve emzirme ile bulaşma olmadığını düşöndürmüştür. Ancak endemik bölgelerde anneden çocuğa tükürük ve kardeşler arası yakın ilişki ile geçiş söz konusu olabilir (33).

KSHV/HHV8 seropozitif hastaların tükürük ve ağız içi dokularında, AIDS-asosiyel Kaposi sarkomu hastaların semenlerinde KSHV/HHV8 DNA'sı saptanmıştır. HIV negatif hastalarda bulaşmanın tükürük ile olduğu düşünölebilir (22). Prostat gland epitelinde de latent KSHV/HHV8 varlığı bildirilmiştir (34, 35). Bu da prostatın viral replikasyonun gerçekleştiği ve daha sonra semene geçtiği yer olduğunu düşöndürür niteliktedir. Bununla birlikte Kaposi sarkomu hastalarında KSHV/HHV8'in en sık kaynağı periferik kan mononökleer hücreleridir (36).

Kaposi sarkomu, primer efüzyon lenfoması (PEL) ve multisentrik Castleman hastalığı KSHV/HHV8 ile kuvvetle ilişkili olup, pemfigus, büllöz pemfigoid, derinin skuamöz hücreli karsinomu, aktinik keratoz, Paget hastalığı, hemanjiyom, anjiyosarkom, sarkoidoz, Kikuchi hastalığı, multipl miyelom, hemofagositik sendrom, tükürük bezi tümörleri gibi hastalıklarda da KSHV/HHV8 DNA varlığına dair bulgular bildirilmektedir (29).

Klasik Kaposi sarkomu

Klasik Kaposi sarkomu orta yaşlı ve yaşlı erkeklerde görölün, özellikle İtalya, Yunanistan, Türkiye ve İsrail'de insidensi göreceli olarak yüksek olan nadir bir hastalıktır (4). Doğu Avrupa ve Akdeniz havzasında sıklıkla 5. ve 7. dekadlarda ve erkeklerde görölür (27, 37). Çocuklarda son derece nadirdir (38). Genel popölasyon bazlı insidens kayıtları öncesinde Kaposi sarkomu için kaynaklarda bildirilen erkek:kadın oranları 10-15:1 düzeyinde iken (1, 14, 27, 37, 39), yakın geçmişte yapılan genel popölasyon bazlı insidens çalışmalarında daha düşük, örneğin İtalya'da 3,9:1, Yunanistan'da 1,6:1 gibi erkek:kadın oranları bildirilmiştir (4).

Endemik Kaposi sarkomu

Endemik (Afrika) Kaposi sarkomu Orta Afrika'da izlenen tüm malign hastalıkların %10'unu oluşturmaktadır (16). Erkek:kadın oranı yetişkinlerde 15:1, çocuklarda 3:1'dir (14, 39). İnsidens yaş ile birlikte artış gösterir: erkeklerde 35-39, kadınlarda 25-39 yaşlarında siktir (4). Afrika yerli zencilerinde, sıklıkla genç popülasyonda izlenen bu tip agresif seyirlidir. Endemik tip Kaposi sarkomu Burkitt lenfoması ile aynı coğrafi dağılımı gösterir ve Güney Afrika'daki genç Bantu çocuklarında sık görülür (40). Çocuklarda görülen lenfadenopatik tipi sıklıkla ölümle sonuçlanmakta ve erkeklerde daha sık görülmektedir (37).

Kampala Cancer Registry, Kaposi sarkomu insidensinin AIDS ile birlikte önemli değişiklik gösterdiğini ortaya koymuştur (14, 41). Uganda'da tüm kanserlerin erkeklerde %48,9'u, kadınlarda ise %17,9'u Kaposi sarkomudur. Bu insidens, 1950'lerden beri erkeklerde on kat, kadınlarda üç kat artmış görünmektedir. Doğumdan 14 yaşına kadar her iki cinsiyette yaklaşık aynı insidens görülmekle birlikte, 5 yaş altındaki kızlarda ve 5-9 yaş arası erkeklerde hafif bir artıştan söz edilebilir (14, 41). Olguların %12'sini oluşturan lenfadenopatik tip %42 oranında çocuklarda görülmektedir (14, 41).

Zambiya'da ise HIV pozitif çocukların %80'inde daha agresif seyirli olduğu bildirilmektedir. Kaposi sarkomu bu ülkede çocukluk çağı tümörlerinin %25'ini oluşturmaktadır. Bu yaş grubunda erkek:kadın oranı 1,76:1'dir (14, 41).

Transplantasyon veya iyatrojenik immünsüpresyon ile birlikte görülen Kaposi sarkomu

Organ transplantasyonu, tümör kemoterapisi, çeşitli nedenlerle uzun süreli kortikosteroid tedavisi ile ilişkili Kaposi sarkomu nadir bir komplikasyon olarak görülür (38). Solid organ transplantasyonu sonrası gelişen kanserlerin yaklaşık %6'sını Kaposi sarkomu oluşturmaktadır (39).

İmmünsüpresyon ile ilişkili Kaposi sarkomu, kadınlarda diğer klinik tiplere göre daha yüksek sıklıkta görülür (42) ve erkek:kadın oranı sadece 2,3:1'dir (39).

Transplantasyon veya iyatrojenik immünsüpresyon ile birlikte görülen Kaposi sarkomu insidensi düşük olup, özellikle böbrek transplantasyonu sonrası immünsüpresyon alan hastalarda %0,5 oranında görülür (42). Kalp, karaciğer ve akciğer transplantasyonlu hastalarda nadirdir (4). Çalışmalarda Kaposi sarkomu prevalansı böbrek transplantasyonu sonrası %0,3 ve %1,6, kalp transplantasyonu sonrası %0,41 olarak saptanmıştır (43, 44, 45). Böbrek transplantasyonlu hastalarda insidens Kaposi sarkomunun endemik olduğu bölgelerde %3,5 iken, Batı Avrupa'da %0,4'dür (14).

Yüksek doz immünsüpresif tedavi alan solid organ transplantasyonlu hastalarda Kaposi sarkomu post-operatif birkaç ay-yıl içinde gelişir (40). Tedavinin başlaması ile lezyonun oluşması arasında geçen süre 2 ay ile 18 yıl (ortalama 20 ay) arasında değişmektedir (46). İmmünsüpresif tedavi KSHV/HHV8'i aktive edici etkisi olan siklosporin içerdiğinde, Kaposi sarkomunun daha sık geliştiği bildirilmiştir (15, 22).

Transplantasyon sonrası görülen Kaposi sarkomunun KSHV/HHV8 reaktivasyonuna bağlı olup olmadığı belirsizdir. Çoğu Kaposi sarkomunun, transplante edilen organ ya da transfüzyon ile yeni infeksiyondan çok, immünsüpresyona bağlı latent KSHV/HHV8 infeksiyonunun reaktivasyonu sonucu geliştiği sanılmaktadır (29).

AIDS-asosiyel Kaposi sarkomu

Kaposi sarkomu HIV infekte hastalarda normal popülasyondan 100 000 kez (39), diğer immünsüprese hastalardan 200 kez daha sık görülmektedir. AIDS'li homoseksüel ve biseksüel erkeklerde ise cinsel temas dışı yollarla HIV infeksiyonu bulaşan bireylerden 10 kez daha sık görülür (47).

Avrupa, Amerika ve Avustralya'da en çok homoseksüel ve biseksüel erkeklerde görülür (38). Ayrıca kadınlarda, çocuklarda, hemofili hastalarında, intravenöz uyuşturucu kullananlarda ve AIDS riski altındaki diğer popülasyonda da düşük oranlarla görülür (37, 38, 42). HIV infeksiyonunun cinsel ilişki ile bulaştığı, eşleri biseksüel olan kadınlarda Kaposi sarkomu prevalansı daha yüksektir (38). Ebeveynleri Kaposi sarkomu gelişimi için risk altında olan ve kan transfüzyonu yoluyla HIV infeksiyonu bulaşan çocuklarda da Kaposi sarkomu gelişim riski yüksektir (38). HIV infeksiyonu gelişen hemofili hastalarında ve kan tranfüzyonu yapılanlarda sık görülmezken, intravenöz uyuşturucu kullananlarda ise orta derece risk mevcuttur (38).

Etyoloji ve Patogenez

Kaposi sarkomunun patogenezini kompleks olup, çok iyi anlaşılabilmiştir (48). Kaposi sarkomu gelişimi, post-transplant Kaposi sarkomu ve AIDS-asosiyel Kaposi sarkomundaki gibi bağışıklık sistemindeki yetersizliklere bağlanmıştır. Bununla birlikte, klasik Kaposi sarkomu ve endemik (Afrika) Kaposi sarkomu hastalarının bağışıklık sistemi fonksiyonları tamdır ve bağışıklık sisteminde yetersizlik olmayan HIV hastalarında da Kaposi sarkomu gelişebilmektedir (2). Kaposi sarkomunun başlaması, muhtemelen inflamatuvar sitokinler ve

kemokinlerin anormal üretimi ile sonuçlanan bağışıklık sistemi düzensizliğiyle ilişkili bulunmuştur (2).

Kaposi sarkomunun klinik ve epidemiyolojik açıdan çeşitli farklılıklarına rağmen, dört tipinin tümünde aynı histolojik bulguların olması, patogeneizde ortak bir mekanizma ve etyolojik ajanın söz konusu olduğunu düşündürmüştür (2). Uzun süre Kaposi sarkomu etkeni olarak infeksiyöz bir ajandan şüphelenilmiştir (18). Kaposi sarkomunun tüm tiplerinde ve yüksek riskli kişiler ile Kaposi sarkomu hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinde KSHV/HHV8 olarak adlandırılan herpesvirüs benzeri DNA sekanslarının saptanması, bu virüsün Kaposi sarkomu patogenezinde rol oynadığını düşündürmüştür (2, 42).

Erken dönem Kaposi sarkomu lezyonlarında sadece iğsi hücrelerin %10'u ve endotelial hücreler KSHV/HHV8 pozitifdir (10). Bu da hastalığın ilerlemesinde parakrin mekanizmaların rol oynadığını akla getirmektedir (10, 49). Geç dönem nodüler lezyonlarda iğsi hücrelerin %90'ının KSHV/HHV8 pozitif olması, virüsün infekte hücrelere büyüme üstünlüğü kazandırdığını düşündürür niteliktedir (34). Bu da erken dönem Kaposi sarkomunun, hastalığın ilerlemesi ile gerçek klonal maligniteye dönüşebilen, poliklonal bir hiperplazi olduğunu düşündürmektedir (50).

Kaposi sarkomunun poliklonal reaktif süreçte benzer şekilde başladığı ve erken Kaposi sarkomunun regrese olabileceğine inanılmaktadır. Ancak, apoptotik gen (bcl-2), onkogen (c-myc, c-int, ras) ve tümör süpresör gen (TP53) ekspresyonlarının deregülasyonu, KSHV/HHV8 latent gen (LANA, v-cycD, v-FLIP, Kaposin) ekspresyonunun devam etmesi ve AIDS-asosiyel Kaposi sarkomunda HIV-1 Tat proteinin proliferatif ve anjiyogenik etkileri, Kaposi sarkomunun zaman içinde gerçek bir malign sarkoma progresyonuna neden olur (2, 51).

Güncel kanıtlar KSHV/HHV8 infeksiyonunun Kaposi sarkomu gelişimi için gerekli olduğunu, ancak yeterli olmadığını göstermektedir. Tek başına KSHV/HHV8 infeksiyonu, Kaposi sarkomunun farklı klinik tiplerini, AIDS-asosiyel (epidemik) Kaposi sarkomunun agresif seyrini, hastalığın erkek cinsiyetindeki yaygınlığını açıklayamamaktadır. Hormonlar, genetik yatkınlık ve/veya başka bir infeksiyon ajanı ile koinfeksiyon gibi kofaktörler, bu hastalığın gelişimi için gerekli görünmektedir (52).

Kaposi Sarcoma Associated Herpesvirus (KSHV)/Human Herpesvirus 8 (HHV8)

Kaposi sarkomu epidemiyolojisi, seksüel yolla geçen infeksiyöz bir ajanı akla getirmiştir (4, 40). Son yıllardaki epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar KSHV/HHV8

lenfotropik herpesvirüs ile Kaposi sarkomu arasında güçlü bir bağlantı olduğunu göstermiştir (48).

Kaposi sarkomu gelişimi için KSHV/HHV8'in gerekli olduğunu destekleyen güçlü kanıtlar vardır (52). Bunlardan birincisi, Kaposi sarkomunun tüm epidemiyolojik formlarında olduğu gibi, tüm evrelerinde de KSHV/HHV8 DNA'sının saptanmasıdır. Buna karşın KSHV/HHV8, lenfoproliferatif hastalıklardan PEL ve multisentrik Castleman hastalığı dışında diğer tümörlerde nadiren bulunmuştur. İkinci olarak, serolojik çalışmalarda Kaposi sarkomu hastalarının çoğunda (%80-100) KSHV/HHV8 antijenlerine spesifik antikorlar gösterilmiştir. Normal kan donörlerinde düşük olan seropozitiflik oranları, HIV pozitif homoseksüel erkekler gibi Kaposi sarkomu gelişimi için risk altında olan popülasyonda belirgin oranda daha yüksektir. Ayrıca seropozitiflik veya KSHV/HHV8 DNA'sının periferik kanda saptanması, kişilerde Kaposi sarkomu gelişeceği öngörüsünü destekleyen güçlü bulgulardır (52).

KSHV/HHV8'in Kaposi sarkomuna nasıl yol açtığı kesin olarak bilinmemekle birlikte, Nickloff ve ark. tarafından iki senaryo üzerinde durulmuştur. Bunlardan biri, otokrin/parakrin mekanizmalar üzerinden lezyon gelişimi için gerekli ortamı oluşturmada KSHV/HHV8'in kritik bir rol oynaması, diğeri ise KSHV/HHV8'in hücreleri doğrudan transforme edici bir etki göstermesidir (52). Gallo ve ark. ise Kaposi sarkomunun büyüme ve anjiyogenik faktörler ile hiperplastik proliferasyon şeklinde başladığını ve belirli şartlar altında hastalığın ilerlemesiyle gerçek bir malign tümör haline geldiğini ileri sürmüşlerdir (49).

Chang ve ark. tarafından Kaposi sarkomu lezyonlarının incelenmesinde, insan Epstein Barr virus (EBV), simian herpesvirus saimiri (HVS) ve murine gamma herpesvirus 68 homologu KSHV/HHV8 saptanmıştır (25). KSHV/HHV8, Rhadinovirus cinsi gamma-2 herpesvirüs alt sınıfından herpesvirüs ailesinin ilk üyesidir (17). KSHV/HHV8, çift sarmal DNA genomu, çekirdekte replikasyon, konak hücrede persistan infeksiyon yapabilme yeteneği gibi herpesvirüslerin tipik özelliklerini taşır. KSHV/HHV8 genomu, 140,5 kb LUR'dan (long unique region) meydana gelmektedir. Bu genom, G+C'den zengin 801 bp (baz çifti) uzunluğunda birçok TRs (terminal repeat sequences [tekrarlayıcı sekanslar]) içermektedir (53). KSHV/HHV8 genomunda iki tip gen tanımlanmıştır. Bunlar diğer herpesvirüslere benzer genler ile, yapısal ve replikasyonla ilişkili proteinleri kodlayan genlerdir (54).

Başlangıçta Kaposi sarcoma associated herpesvirus, daha sonra human herpesvirus 8 olarak tanımlanan bu virüs 85'den fazla open reading frames (ORFs) kodlar. Bu genlerin

70'inden fazlası diğer herpesvirüslere benzer, yaklaşık 15 tanesi (K1-15) ise KSHV/HHV8 için özgül dizi içermektedir. Bu genlerin çoğu hücrel proteinlerin homologunu kodlar ve Kaposi sarkomu patogeneğinde rol alan genlere transforme olur (52). KSHV/HHV8, apoptozu inhibe eden (vBcl-2 ve vFLIP), hücre siklusu disregülasyonunu tetikleyen (v-cyclin, LANA) ve sitokin/kemokin fonksiyonu gören (vIL-6, vMIP-I, vMIP-II, vMIP-III) genler kodlar.

Geç dönem lezyonlarda klonal büyümeden, hücre siklusu ve apoptozu etkileyen latent gen ürünlerinin sorumlu olduğu düşünülürken, litik replikasyon süresince eksprese edilen genler ise virüs üremesi ve konak cevabının inhibisyonundan sorumludur (50).

Çalışmalar bu genlerin çoğunun KSHV/HHV8 infeksiyonunun litik döneminde eksprese edildiğini göstermiştir. Bu dönemde vIL-6 onkogeni de eksprese edilir. Bununla birlikte, Kaposi sarkomu çoğunlukla latent olarak infekte hücrelerden gelişir. Kritik faktörler olarak bilinen viral onkogenlerden FLIP protein, LANA ve v-cyclin, infeksiyonun latent döneminde eksprese edilir (55).

KSHV/HHV8 ile infekte lenfoma hücre kültürlerinde bütirat veya forbol ester ile viral gen ekspresyonu indüklenebilir. Bu cevaba dayanılarak KSHV/HHV8 transkriptleri üçe ayrılmıştır. Latent olarak eksprese edilen ve indüksiyondan etkilenmeyen vFLIP ve v-cyclinD Class I, sadece uygun stimülasyon ile saptanan ve yapısal viral genlerin hakim olduğu genler Class III, latent olarak düşük seviyede eksprese edilen ancak indüksiyon ile ekspresyonu artan K7 (T1.1/nut-1) ise Class II olarak sınıflandırılmıştır (54). Class I genler latent, Class III genler litik, Class II genler hem latent hem litik infeksiyon ile ilişkilidir (56).

ORF K1 ve K15 gen analizlerine dayanılarak 5 KSHV/HHV8 varyantı (grup A-E) tanımlanmıştır. Grup A ve C, Avrupa ve Kuzey Amerika'da, B Afrika'da, D ve E Pasifik ada popülasyonunda hakimdir (29, 57).

KSHV/HHV8 Latent İnfeksiyonu ile İlişkili Genler

LANA-1 (ORF 73)

Latent nükleer antijen-1 (latency associated nuclear antigen-1 [LANA-1], latent nuclear antigen-1 [LNA-1]), hücrel homologu olmayan, bununla birlikte aynı gen lokusunda HVS'de viral homologu ORF 73 olan KSHV/HSV8 genidir (58).

LANA-1'in, viral DNA'nın transkripsiyon ve replikasyonunda fonksiyonu vardır ve viral DNA'yı interfaz ve mitoz esnasında konak kromatinine bağlar (59). LANA-1, transkripsiyonel aktiviteyi ve p53'ün apoptoz yeteneğini durdurur (59). LANA-1, retinoblastom proteinine (pRb) bağlanarak E2F olarak adlandırılan regülatör proteinini

serbestleştirir ve hücre siklus ilerlemesinde transkripsiyon genlerini aktive eden kofaktör gibi rol oynar (60).

v-cyclin D (ORF 72)

Hücre büyümesi üzerindeki etkileri ile Kaposi sarkomu progresyonunda rol oynar (2). v-cyclin D, hücresel siklinler gibi siklin bağımlı kinazlar (Cdk6) ile aktif bir kompleks oluşturur, bu da pRb fosforilasyonu ve inaktivasyonuna neden olur (36).

vFLIP (ORF K13/ORF 71)

ORF71, cFLIP (cellular Fas-ligand-interleukin 2-converting enzyme [FLICE] inhibitor protein) homologu, hücreleri Fas-bağımlı apoptozdan koruyan vFLIP kodlar (50, 55).

Kaposin (T0.7 transcript, ORF K12)

Viral patogeneze katkısı net olmayan bir onkogendir. Kaposin, Kaposi sarkomu hücrelerini transforme ederek Kaposi sarkomunun nodüler evreye progresyonunu etkileyebilir (2).

İn-situ hibridizasyon ile T0.7 transkriptinin erken-geç dönem tüm Kaposi sarkomu lezyonlarında eksprese edildiği gösterilmiştir (34, 61, 62). Geç dönem lezyonlarda iğsi hücrelerin çoğunda pozitif olması, latent enfeksiyonda önemli rolü olduğunu düşündürmektedir.

KSHV/HHV8 Litik İnfeksiyonu ile İlişkili Genler

KSHV/HHV8, diğer herpesvirüslerde bulunmayan ve belki de Kaposi sarkomu patogenezi etkileyecek ilginç özellikleri bulunan litik genler kodlar (63). Bu genler in vitro çalışmalarda ve hayvan modellerinde transformasyonu indüklemeye yeteneği göstermekle birlikte, Kaposi sarkomu iğsi hücrelerinin büyük kısmında eksprese edilmedikleri akılda tutulmalıdır. Bununla birlikte bu genler, az miktardaki tümör hücresindeki ekspresyonlarıyla, latent olarak infekte olan komşu hücrelere yönelik güçlü parakrin sinyaller yoluyla Kaposi sarkomu patogenezi katkıda bulunurlar (64).

vIL-6 (ORF K2)

Multisentrik Castleman hastalığında, primer efüzyon lenfomasında ve nadiren Kaposi sarkomu lezyonlarında eksprese edilen vIL-6, Kaposi sarkomu gelişiminden çok,

KSHV/HHV8 ilişkili lenfoproliferatif hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynar (63). vIL-6, IL-6 reseptör yolunu sürekli uyararak ve virüs ile infekte hücreleri apoptozdan koruyarak, KSHV/HHV8 infeksiyonunun progresyonuna katkıda bulunur (65). vIL-6 ayrıca VEGF (vascular endothelial growth factor) ekspresyonunun artışına neden olarak anjiyogeneizde rol oynar (66).

vBcl-2 (ORF 16)

vBcl-2, insan Bcl-2 ailesinden Bcl-2 ve Bax homologudur. vBcl-2, Bax-bağımlı apoptozu önler. vBcl-2, litik replikasyon süresince konak cevabını inhibe eder (50).

vGPCR (ORF 74)

vGPCR (G protein coupled receptor), insanda IL-8 reseptörleri olan CXCR1 ve CXCR2 ile yakından ilişkilidir ve böylece IL-8'i bağlayabilir (67). vGPCR, az sayıdaki tümör hücresinde eksprese edilmesine rağmen, özellikle latent KSHV/HHV8 infekte hücrelerde parakrin mekanizmalarla tümör progresyonuna yol açabilir (68).

vMIP-I (K6), vMIP-II (K4), vMIP-III (K4.1)

Bu proteinlerin, tavuk koryoallantoik assayde yüksek anjiyogenik etkili oldukları gösterilmiştir. Bu da Kaposi sarkomu lezyonlarında anjiyogeneizde kritik rol oynadıklarını düşündürmektedir (69).

vIRFs

KSHV/HHV8 insan IRF (interferon regulatory factor) homologu olan 4 gen kodlar (70). Bunlar ORF K9 (vIRF-1), ORF K11 (vIRF-2), ORF K10.5/10.7 (vIRF-3) ve ORF K10/10.1 (vIRF-4)'dir. vIRF, β -interferon gen transkripsiyonunu inhibe ederek konak antiviral cevabını engeller (36).

ORF K1

Simian herpesvirus saimiri STP (simian-transforming protein), EBV LMP1 (latent membrane protein 1) ile aynı genomik lokusta bulunur (50, 58, 63). Bilinen viral veya insan protein homologu yoktur (58) ve transmembran proteini kodlar (50).

ORF K15 (LAMP)

Epstein Barr virus LMP2A ile aynı genomik lokusda bulunur (65). Transmembran protein kodlar.

ORF K3 ve K5

ORF K3 ve K5, amino asit seviyesinde %40 benzerlik gösterir ve MHC (major histocompatibility complex) Class I moleküllerinin ekspresyonunu baskılar (50).

KSHV/HHV8 latent ve litik gen ürünlerinin Kaposi sarkomu patogenezindeki potansiyel fonksiyonları Tablo 1’de özetlenmektedir.

Tablo 1: KSHV/HHV8 Gen Ürünlerinin Fonksiyonları (71)

KSHV/HHV8 ORF	Gen Ürünü	Potansiyel Fonksiyonu
Litik		
K1	Transmembran glikoprotein	Lenfosit ölümsüzleşmesi.
K3/K5	İmmün modülatörler	MHC class I, ICAM-1 ve B7-2 ekspresyonunun baskılanması.
K4, K4.1, K6	vMIPs	Anjiyogenezin tetiklenmesi.
K9	vIRF	IFN-bağımlı sinyallerin inhibisyonu, hücre transformasyonu.
16	vBCL-2	Apoptoz inhibisyonu.
50	Rta	Viral litik replikasyonun başlatılması, insan ve vIL-6 aktivasyonu.
74	vGPCR	IL-8’e bağlanma, VEGF indüksiyonu, hücre transformasyonu.
Latent/litik		
K2	vIL-6	Hematopoez ve B hücre diferansiyasyonun indüklenmesi, VEGF indüksiyonu, PEL hücrelerinin otokrin büyümesinin uyarılması.
Latent		
K12	Kaposin	Hücre transformasyonu.
71	vFLIP	Fas-bağımlı apoptoz inhibisyonu.
72	vCyc	Hücre siklusu duraklamasının inhibisyonu.
73	LANA	Rb ve p53 proteinlerinin deregülasyonu.

ORF: open reading frame, vMIPs: viral macrophage inflammatory proteins, vIRF: viral interferon regulatory factor, Rta: replication and transcription activator, vGPCR: viral G protein coupled receptor, vFLIP: viral Fas-ligand-interleukin 2 converting enzyme [FLICE] inhibitor protein, LANA: latency-associated nuclear antigen, MHC: major histocompatibility complex, ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1, VEGF: vascular endothelial growth factor, Rb: retinoblastoma, PEL: primer efüzyon lenfoması.

Human Immunodeficiency Virus (HIV)

Kaposi sarkomu gelişimi için HIV-1 enfeksiyonu kesin olarak gerekmemekle beraber, agresif seyirli AIDS-asosiyel Kaposi sarkomu patogeneğinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (52, 72). HIV ile enfekte hastalarda Kaposi sarkomu gelişiminin genel popülasyondan çok fazla olması, HIV'in önemli bir etken olabileceği kuşkusunu artırmıştır.

Kaposi sarkomunun agresif seyri ve HIV-1 enfeksiyonu ile birlikte daha sık görülmesi, HIV'in kendisi ya da enfeksiyon süresince üretilen moleküllerin Kaposi sarkomu gelişimi ve progresyonunda rol oynadığını düşündürmüştür (73). Kan ve dokularda HIV yükünü azaltan HAART (highly active antiretroviral therapy) ile tedavi edilen bireylerde AIDS-asosiyel Kaposi sarkomu insidansının düşük olması ve regresyonu bu fikri desteklemiştir.

Çalışmalarda Kaposi sarkomu hücrelerinin kendilerinin HIV-1 ile enfekte olmadığı gösterilmesiyle HIV-1'in, AIDS-asosiyel Kaposi sarkomunda direkt onkojenik rol oynamadığı düşünülmüştür (52, 74). Bununla birlikte HIV-1'in kesin rolü tam olarak anlaşılamamıştır. HIV-1'in immünsüpresyon oluşturarak pasif bir rol mü oynadığı, yoksa patogeneze üzerine daha direkt bir etkisi mi olduğu araştırılmaktadır (52, 72).

HIV-1 belki de immünsüpresyon ile KSHV/HHV8 enfeksiyonu ve replikasyonu için gerekli hedef hücreleri ve çevreyi uygun hale getirmesi, direkt etki yoluyla da KSHV/HHV8 gen ekspresyonu ve viral replikasyonu artırması ile KSHV/HHV8 patogeneğini birçok düzeyde etkilemektedir (75). HIV-1, Kaposi sarkomunun inisyasyon ve progresyonunda, Tat protein ve inflamatuvar sitokin üretimini artırması ile iki kritik parakrin mekanizmaya katkıda bulunmaktadır (76, 77).

HIV-1 enfekte T hücreleri, monosit/makrofajlar ve dendritik hücrelerin TNF- α ve IL-1 β gibi inflamatuvar sitokinleri sekrete ettiği, kronik viral enfeksiyon ve immün sistem uyarılması nedeniyle HIV-1 enfekte hastalarda IL(interlökin)-1, IL-3, IL-4, IFN(interferon)- γ , TNF(tümör nekroz faktörü)- α , TNF- β , TGF(transforming growth factor)- β ve onkostatin-M seviyelerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (78). Kaposi sarkomu tümör hücrelerinin büyüme ve proliferasyonunda önemli olan sitokinler, ayrıca KSHV/HHV8 replikasyonun indüklenmesinde önemli rol oynar. KSHV/HHV8'in çoğalması, lokal virüs yükünün artmasında önemli olabilir ve AIDS-asosiyel Kaposi sarkomunun agresif seyirini açıklayabilir (52).

AIDS-asosiyel Kaposi sarkomunun patogeneğinde önemli rol oynayan HIV-1 Tat protein, anjiyogenik faktör olan bFGF (basic fibroblast growth factor) ile heparan sülfat proteoglikanın sağladığı bağlanma yerleri için yarışır. Böylece serbest bFGF düzeyini

artırarak Kaposi sarkomu hücrelerinin büyümesini sağlar (79, 80, 81). HIV-1 Tat protein VEGF-A reseptörü VEGFR-2'ye (Flk-1/KDR) bağlanarak direkt anjiyogenik faktör gibi rol oynayabilir (82). Ayrıca, HIV-1 Tat protein virüs yükünü ve vGPCR, vBcl-2, vIRF1 gibi viral genlerin ekspresyonunu artırarak KSHV/HHV8'i aktive eder (55, 83).

KSHV/HHV8 ve Kaposi sarkomu insidensinin yüksek olduğu yerlerde HIV-1 infeksiyon oranı da yüksektir. Oysa KSHV/HHV8 insidensinin yüksek, Kaposi sarkomu insidensinin düşük olduğu yerlerde HIV-1 infeksiyon düzeyleri düşükken, HIV-2 infeksiyon düzeyleri ise yüksektir. Bu bulgular, HIV-1 ve HIV-2'nin Kaposi sarkomunda KSHV/HHV8 için kofaktör yeteneklerinde önemli farklılıklar olduğunu düşündürmektedir (77).

Sitokinler

Eksojen ve endojen büyüme faktörleri ile birçok sitokinin aşırı üretimi, Kaposi sarkomu gelişimi ve progresyonuna yol açan otokrin ve parakrin fonksiyonlu başka büyüme faktörlerinin uyarılmasına neden olur (4). Bu büyüme faktörleri, PDGF(platelet derived growth factor)- β , TNF, interlökinler, bFGF, onkostatın-M, VEGF, GMCSF (granulocyte-macrophage-colony stimulating factor), TGF- β ve γ -interferon'dur (4). Kaposi sarkomu lezyonlarında otokrin ve parakrin mekanizmalar ile bu sitokinlerin üretimi, tümörün inisyasyonu ve progresyonu için gerekli çevreyi yaratmaktadır (52).

Kaposi sarkomu inisyasyonunda inflamatuvar sitokinlerin 4 temel sistemik etkisi vardır: 1-Kaposi sarkomu iğsi hücre öncülerinin proliferasyonu ve diferansiyasyonu; 2-Damar aktivasyonu ve inflamatuvar hücrelerin ekstrasvazasyonu; 3-HIV-1 gen ekspresyonu ve replikasyonu ile HIV-1 Tat protein üretimi ve salınmasının indüksiyonu; 4-Dolanan hücrelerde KSHV/HHV8'in reaktivasyonu ve virüsün dokulara yayılması (3). Ayrıca, inflamatuvar hücrelerin çağırılması, monositik hücrelerin makrofaj ve dendritik hücrelere diferansiyasyonu ve aktivasyonu, endotelial hücrelerde iğsi morfolojinin aktivasyonu ve anjiyogenez gibi lokal etkiler de söz konusudur.

Kaposi sarkomu hücrelerinin kültür ortamında biyolojik aktif sitokinler (bFGF, IL-1 β , PDGF, GMCSF, IL6 gibi) ürettiği ve saldıgı gösterilmiştir. Bu sitokinler yalnızca otokrin büyüme faktörleri gibi rol oynamaz. Aynı zamanda normal endotel hücrelerinin proliferasyonunu uyarır ve anjiyogenezi indükler (52, 84).

Başlıca sitokinler ile anjiyogenik ve kemotaktik faktörlerin Kaposi sarkomu patogenezindeki rolleri Tablo 2'de özetlenmektedir.

Tablo 2: Kaposi Sarkomu Patogenezinde Rol Oynayan Başlıca Sitokinler, Anjiyogenik ve Kemotaktik Faktörler (3)

Faktör	Kaposi sarkomu patogenezinde olası rol
IL-1α, β	Endotelial Kaposi sarkomu hücrelerinde iğsi morfolojinin ve proliferasyonun indüklenmesi, inflamatuvar hücrelerin dokularda toplanması ve hücre diferansiyasyonu.
TNFα, β	Endotelial Kaposi sarkomu hücrelerinde iğsi morfolojinin ve proliferasyonun indüklenmesi, inflamatuvar hücrelerin dokularda toplanması ve hücre diferansiyasyonu, Kaposi sarkomu progresyonu.
IFNγ	Endotelial hücrelerde iğsi morfolojinin indüklenmesi, inflamatuvar hücrelerin dokularda toplanması ve hücre diferansiyasyonu, Tat duyarlı indüksiyon, Kaposi sarkomu progresyonu.
bFGF	Endotelial Kaposi sarkomu hücrelerinin proliferasyonuna ve anjiyogeneze güçlü etki, anjiyogenez ve ödem indüksiyonunda HIV-1 Tat protein ve VEGF ile sinerjik etki.
VEGF	Anjiyogenez ve ödem indüksiyonunda bFGF ile sinerjik etki.
MCP-1	Dolanın inflamatuvar hücrelerin çağırılması.
IL-8	Dolanın inflamatuvar hücrelerin çağırılması.
MIP1α, MIP1β	Dolanın inflamatuvar hücrelerin çağırılması.

IL: interlökin, TNF: tümör nekroz faktörü, IFN: interferon, bFGF: basic fibroblast growth factor, VEGF: vascular endothelial growth factor, MCP: monocyte chemotactic protein, MIP: macrophage inflammatory protein.

Demir

Kaposi sarkomu lezyonları sıklıkla hemosiderin yüklü makrofajlar içerir. Lezyonel demirin kaynağının ekstrasvaze kırmızı kan hücreleri olduğuna inanılmaktadır (85). Demir oksitli volkanik balçıktan zengin coğrafik alanlar olan Afrika ve Akdeniz bölgelerinde endemik ve klasik Kaposi sarkomunun görülmesi gibi epidemiyolojik veriler ışığında, demirin Kaposi sarkomu patogenezinde önemli bir kofaktör olarak rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (86).

III-KAPOSİ SARKOMUNDA HÜCRE KÖKENİ

Kaposi sarkomunda iğsi hücrelerin kökeni tartışmalıdır (50, 85). Kaposi sarkomu lezyonları iğsi hücrelerin ortaya çıkmasından önce T hücreleri, makrofajlar ve dermal dendritik hücrelerden oluşan bir inflamatuvar hücre infiltrasyonu içerir. Bu inflamatuvar hücrelerden sitokin üretiminin, ilk iğsi hücrelerin oluşumunu tetiklediği ileri sürülmektedir (87). Elektron mikroskopik çalışmalar, iğsi hücrelerin endotelial hücrelere benzediğini gösteren pek çok bulgu ortaya çıkarmıştır. Bu hücrelerin çoğunluğu lenfatik endotelial hücre antijenleri (VEGFR-3, podoplanin) eksprese ederken (88), bazıları düz kas (aktin), makrofaj (CD68) ve dendritik hücre proteinleri eksprese eder. Bu bulgular hücrelerin muhtemelen multipotent prekürsör hücrelerden türediğini düşündürmektedir (50).

İğsi hücrelerde endotelyal antijenler (FVIIIrAg, CD34, CD31 vb), monosit/makrofaj antijenleri (CD68, PAM-1 vb), fibroblast, düz kas ve diğer hücre tiplerine yönelik antikolar ile yapılan immünohistokimyasal çalışmalar iğsi hücrelerin kökenini tam olarak aydınlatamamıştır (89). Bununla birlikte bir çok araştırmacı iğsi hücrelerin endotelyal hücrelerden köken aldığı sonucuna varmışlardır (89). Son çalışmalar ise, iğsi hücrelerin vasküler (kan damarları) veya lenfatik endotelyal prekürsörlerden hangisinden köken aldığı konusu üzerinde odaklanmaktadır. Kan damarlarına spesifik VW/PaE ve eNOS gibi antijenler ile iğsi hücrelerde reaksiyon görülmemesi, lenfatik kökeni düşündürmüştür. Podoplanin ve VEGFR-3'ün iğsi hücrelerde yüksek ekspresyonunun saptanması da bu hipotezi desteklemiştir. Lenfatik endotelyal hücrelere spesifik podoplanin ve VEGFR-3, AIDS-asosiyel ve klasik Kaposi sarkomunda tüm evrelerdeki tümör hücrelerinde in vivo olarak saptanmıştır (10, 88).

Kaposi sarkomu iğsi hücrelerinin kökenini lenfatik endotelyal hücrelere bağlayan en son kanıtlar üç moleküler çalışmadan kaynaklanmaktadır. Birinci çalışmada, microarray gen ekspresyonu profilinde Kaposi sarkomu tümör hücrelerinin kan damarı endotel hücrelerinden çok, lenfatik endotelyal hücrelere benzediği gösterilmiştir (90). İkinci çalışmada Hong ve ark., KSHV/HHV8 infeksiyonu ile diferansiyel olan kan damarı endotelyal hücrelerinin, lenfatik gelişimde ana düzenleyici olan Prox-1'i de içeren lenfatik spesifik genlerin %70'inin indüklenmesi ve kan damarı genlerinin baskılanması ile, damarların lenfatik yönde yeniden programlandıklarını ileri sürmüşlerdir (91). Üçüncü çalışmada KSHV/HHV8 infeksiyonu sonrası ölümsüzleşen insan dermal mikrovasküler endotel hücrelerinde VEGFR-3, podoplanin, LYVE-1 ve Prox-1 gibi spesifik endotelyal genlerin ekspresyonunun belirgin olarak arttığı saptanmıştır (92). Bu üç çalışmanın sonuçları, KSHV/HHV8 latent infeksiyonu ile kan damarı endotelyal hücrelerinin lenfatik fenotip kazandığını düşündürmektedir (89).

IV-KAPOSİ SARKOMUNDA KLİNİK BULGULAR

Klasik (Akdeniz) Kaposi sarkomu

Kronik veya "Avrupa" tipi (42) olarak da adlandırılan klasik Kaposi sarkomu, tipik olarak distal alt ekstremitelerde özellikle ayak bileği ve tabanında (19, 23), unilateral veya bilateral olarak başlar (42). Lezyonların çapı birkaç milimetre ile santimetre arasında değişebilir (19). Zamanla lezyonların sayısı artabilir ve daha proksimalde oluşabilir. Üst ekstremiteler de etkilenebilir ve hatta bazen hastalığın başlangıç yeri de olabilir.

Kaposi sarkomu lezyonları karakteristik olarak birbirini izleyen yama/makül (patch), plak ve nodül evreleri olarak görülür. Farklı evredeki klinik lezyonlar aynı hastada bir arada bulunabilir (42). Lezyonlar yavaş yavaş birleşebilir ve nodüler lezyonlar ülser olabilir. Bazı lezyonlar gerilerken, bazıları ise ilerleyebilir.

Mukoza lezyonları nadirdir (16). Lenfatiklerin etkilenmesi ile alt ekstremiteler ve genital bölgede ödem görülür (23).

Klasik tip Kaposi sarkomu hastalarında sıklıkla hematopoetik orijinli, özellikle non-Hodgkin lenfomalar başta olmak üzere ikinci bir primer neoplazi gelişebilir (16, 19, 38, 42). Kronik seyirlidir, ölüm genellikle başka nedenlerle olur (38).

Endemik (Afrika) Kaposi sarkomu

Genç popülasyonda görülen ve çocukları etkileyebilen bu tip 4 alt klinik sınıfa ayrılabilir: Nodüler, florid ya da vejetatif, infiltratif ve lenfadenopatik tipler (42). **Nodüler tip** iyi sınırlı deri nodülleri şeklinde ortaya çıkar ve klasik Kaposi sarkomu gibi benign seyirlidir (19, 38, 42). Bu lezyonlar bazen kendiliğinden gerileyebilir (93). **Florid (vejetatif) tip** daha agresif biyolojik davranışlı, genellikle yumuşak doku ve kemik tutulumu da yapan, bir veya daha fazla ekstremitede görülen kutanöz lezyonlardır. Kemoterapi ile yaşam süreleri uzatılabilir de, nodüler tipten daha kötü prognozudur (93). **İnfiltratif tip** daha agresif seyirli olup, viseral lezyonlar vardır (38, 42). Özellikle solunum sistemi ve gastrointestinal sistem tutulumu görülür (93). **Lenfadenopatik tip** tek belirti olarak genellikle yaygın lenf nodu tutulumu ile ortaya çıkar. Başlıca çocuklarda görülür (37, 42, 93) ve fatal seyirlidir (16). Lenf nodları ve viseral tutulumla sıklıkla deri ve müköz membran tutulumu da eşlik eder.

Transplantasyon veya iyatrojenik immünsüpresyon ile birlikte görülen Kaposi sarkomu

Organ transplantasyonu ve immünsüpresyonun nadir bir komplikasyonu olarak izlenen bu tip, diğer tiplerden farklı biçimde göreceli olarak kadınlarda daha sık görülür ve kutanöz, viseral tutulum olabilir (42). Hastaların yarısında lenf nodu, mukoza ve iç organ tutulumu görülürken, deri lezyonları olmayabilir (40).

İmmünsüpresyon tedavisinin azaltılması veya kaldırılması ile lezyonlar gerileyebilir (16, 42). Klinik seyri klasik Kaposi sarkomundan daha agresiftir ve hastaların önemli kısmı hastalığın yayılması ile kaybedilir (38, 42).

AIDS-asosiyе (epidemik) Kaposi sarkomu

Özellikle vücudun üst yarısını, gövde, kollar, baş ve boyun bölgesini etkileyen AIDS-asosiyе Kaposi sarkomunda iç organlar ve mukozalar da etkilenir (16, 38, 42). Genellikle küçük ve sayıca az olan lezyonlar, açık eflatun veya pembe renklidir (42).

Deri lezyonları, kırmızı renkli kutanöz veya mukozal makül veya papüller ile karakterizedir. Lezyonlar donuk, açık kahve veya pembe renkli maküller şeklinde olabilir. Bu da koyu renkli kişilerde diğer cilt anomalilerinden ayırımı zorlaştırır. Her yerde gelişebilen kutanöz lezyonlar özellikle burun ve retroauriküler bölge başta olmak üzere yüz, gövde ve alt ekstremitelerde daha sık görülür. Kaposi sarkomu, Langer çizgilerini izleyen simetrik anatomik dağılım gösterebilir. Genellikle yassı lezyonlardan nodüler lezyonlara ilerlese de, bazen başlangıçtan beri görünür olmayan palpabl lezyonlar şeklinde ortaya çıkabilir. Lezyonlar ilerledikçe irileşir, yassı lezyonlar papül, papüller ise birleşerek plaklar oluşturur. Lezyonlar ülsere olabilir ve özellikle ödemli bölgelerde ağrılıdır (94).

İlerlemiş Kaposi sarkomunda alt ekstremitelerde, genital bölge ve periorbital yumuşak dokuda tümör ile ilişkili ödem görülebilir. Mukozal lezyonlar ağız içinde damak, gingiva, dil, dudak ve tonsilde gelişebilir. Deri dışı tutulum yerleri sıklık sırasıyla lenf nodu, gastrointestinal sistem ve akciğerlerdir. Sık olmayan gastrointestinal sistem tutulumu genellikle asemptomatiktir ve prognozu etkilemez. Pulmoner Kaposi sarkomu ise semptomatiktir ve prognozu olumsuz etkiler (94).

Klinik seyir kronik veya hızlı gidişli olabilir. Hastaların çoğu fırsatçı infeksiyonlar veya AIDS komplikasyonları ile kaybedilir (38).

Nadir varyantlar

Radikal mastektomili hastalarda ipsilateral üst ekstremitede kronik lenfödeme bağlı olarak Kaposi sarkomu (Stewart-Treves benzeri sendrom) gelişebileceği bildirilmiştir (42).

Nadir görülen bir diğer tip ise lenfanjiyom benzeri Kaposi sarkomudur (42). Özellikle bacakların distal kısımlarında, genişlemiş vasküler boşluklar büllöz görünümde bir erüpsiyon oluşturur (1). Bu şekli tüm olguların %5'inden azını oluşturur (38).

Ayrıca telenjiyektazik, ekimotik, keloidal ve kavernöz Kaposi sarkomu varyantları da tanımlanmıştır (1).

V-KAPOSİ SARKOMUNDA HİSTOPATOLOJİ

Kaposi sarkomunun tüm klinik şekillerinde histopatolojik özellikler aynıdır. Birbirini izleyen makül/yama (patch), plak ve nodül evreleri gözlenir.

Makül/yama (patch) evresi

Değişiklikler en çok retiküler dermiste gözlenir. Normal veya ektazik dermal kan damarları ve deri ekleri çevresinde düzensiz damar proliferasyonu, dikkat çekmeyen ilk vasküler değişiklikler olarak saptanabilir (42). Bu damarlar epidermise paralel dizilir (16). Yeni oluşan damarların normal veya önceden mevcut olanları çevrelemesi ve kısmen normal dermal yapılardan ayırması “promontory sign” olarak adlandırılan bir bulgudur (37, 42). Bazı lezyonlarda damarlar küme oluşturacak şekilde toplanarak küçük hemanjiyomlara benzeyebilir. Endotel dikkati çekmeyebileceği gibi, küçük, atipi ve mitotik aktivite gösteren tek sıralı hücreler halinde de olabilir (42). Kollajen demetler arasında düzensiz, dallanan, ince duvarlı damarlar görülebilir (38, 42).

Yeni oluşan damarlar ile yakın ilişkili, az sayıda iğsi hücreler görülebilir. Ayrıca apoptotik endotelial hücreler, ekstrasöz eritrositler, hemosiderin ve hiyalen globüller saptanabilen diğer bulgulardır (42). Ekstrasözler olarak veya makrofajlarda intrasözler olarak izlenen PAS pozitif, diyastaza dirençli, küçük, 1-7 µ büyüklükte eozinofilik kürelerden oluşan hiyalen globüller, tanıya yardımcı bir kriterdir (37, 42). Bu eozinofilik hiyalen globüller ilk olarak Afrika’lı hastalarda tanımlanmıştır. Ancak AIDS-asosiy ve klasik Kaposi sarkomunda da görülebilir (16, 38). Bu evrede görülen değişken perivasküler iltihabi infiltrasyon lenfositlerden baskın olup, kısmen plazma hücreleri de içerir (37, 42).

Bu evredeki Kaposi sarkomu lezyonlarının granülasyon dokusuna benzerliği nedeniyle tanınması zordur (16, 40).

Plak evresi

Tüm dermis ve yüzeysel subkutan doku tutulumu olan bu evrede, karakteristik bulgu dermal kollajen demetler arasında dağılan ve dermal damarlar etrafındaki iğsi hücrelerdir. Bu iğsi hücreler arasında, az sayıda eritrosit içeren vasküler yapılar meydana getiren, yarık benzeri boşluklar oluşur (42). Dermiste kollajeni ortadan kaldırarak geniş bir alanı kaplayan küçük kan damarlarının diffüz infiltrasyonu görülür (37). Hemosiderin birikimi ve hiyalen

globüller daha belirgindir. Plazma hücreleri içeren perivasküler lenfositik infiltrasyon devam eder (42).

Nodül evresi

İğsi hücreler proliferasyon olarak birbiri ile kesişen demetler ve tabakalar oluşturur (40, 42). Bu iğsi hücrelerin arasında, eritrosit içeren yarık benzeri vasküler boşluklar vardır (16, 42). İğsi hücrelerden ve vasküler boşluklardan oluşan iyi sınırlanmış nodüller dermal kollajenin yerini alır (37). Kan dolu boşluk veya yarıkların iğsi hücrelerle yakın ilişkisi ile oluşan petek benzeri görünüm karakteristik bir bulgudur (37). İğsi şekilli, ovoid çekirdekli hücrelerde orta-şiddetli sitolojik atipi olabilir.

Apoptotik hücreler, hiyalen globüller ve hemosiderin birikimi görülebilir. Mitoz değişen oranlarda saptanabilir. Dermal lenfoplazmasitik infiltrasyon sürer. Nodüllerin periferinde ektazik kan damarları ve lenfatikler vardır (16, 42).

Lenfanjiyomatöz veya lenfanjiyom benzeri Kaposi sarkomu lezyonları, tüm dermisi etkiler ve superfisiyel subkutan dokuya uzanabilir. Angüle, irregüler, dar/ektazik, tek sıralı yassı endotel hücreleriyle döşeli ince duvarlı vasküler yapılar kollajen demetleri ayırır. Vasküler boşlukların çoğu eritrosit içermez. Kaposi sarkomu lezyonlarına tipik olarak eşlik eden inflamatuvar infiltrasyon, ekstrasvaze eritrositler, hemosiderin ve hiyalen globüller bulunmaz (38, 42).

Afrika'da ve sporadik vakalarda **anaplastik tip** olarak tanımlanan lezyonlarda ise artmış selülarite, nükleer pleomorfizm ve sık mitoz izlenir (38). Bu lezyonlarda vasküler komponent azalmış veya kaybolmuştur (37). Bu lezyonlarda eritrosit fagositozu ve hiyalen globül varlığı tümör kökenine ilişkin ipucu oluşturabilir (37).

VI-KAPOSİ SARKOMUNDA AYIRICI TANI

Erken dönem maküler veya geç dönem agresif lezyonların her ikisinde de ayırıcı tanıda birçok zorlukla karşılaşılmaktadır.

Erken maküler lezyonlarda, inflamatuvar bir durum veya hücreden fakir histiyositom; geç maküler lezyonlarda iyi diferansiye anjiyosarkom, lenfanjiyom, targetoid hemosiderotik hemanjiyom, mikrovenüler hemanjiyom; nodüler lezyonlarda piyojenik granülom, iğsi hücreli

hemanjiyom, Kaposiform hemanjiyoendotelyom, iğsi hücreli orta derecede diferansiye anjiyosarkom, anevrizmal benign fibröz histiyositom; geç dönem agresif lezyonlarda ise fibrosarkom, leiomyosarkom, monofazik sinoviyal sarkom, malign hücreli mavi nevüs, desmoplastik melanom ayırıcı tanıya girebilir (37).

Lenfanjiyom

Klinik özellikler ile birlikte lenfanjiyomda inflamatuvar hücrelerin, özellikle plazma hücrelerinin görülmemesi ayırıcı tanıda önemlidir (37). Tek sıralı endotelyal hücrelerle döşeli genişlemiş lenfatik damarlar ile karakterizedir.

Targetoid Hemosiderotik Hemanjiyom

Üst dermiste sınırlı, “hobnail” endotelyal hücrelerin vasküler boşluklara protrüzyon oluşturduğu, hemosiderin birikiminin belirgin, inflamatuvar hücrelerin nadir izlendiği bir lezyondur (37).

Mikrovenüler Hemanjiyom

Venüler diferansiyasyonu düşündüren, perisitler ve düz kas hücreleri ile çevrelenmiş kan içeren damarlardan oluşur (37).

Piyojenik Granülom (Lobüler Kapiller Hemanjiyom)

Ödem, inflamasyon ve vasküler proliferasyon ile karakterizedir (95). Tümörün hücreden daha zengin olduğu yüzeysel alanlarında geniş vasküler yapılar bulunur. Klinik bulguların yanısıra, lezyonun iyi sınırlı olması, iğsi hücreli alanların olmaması ayırıcı tanıda yararlı bulgulardır (96).

Kavernöz Hemanjiyom

Genellikle çocuklarda ve üst ekstremitelerde görülür (96). Histolojik olarak geniş ve yassı endotelyal hücrelerle döşeli kan damarlarından oluşur.

Masson Hemanjiyomu

Dilate damarların lümenlerinde lokalize endotelyal hücrelerin papiller proliferasyonu ile karakterizedir (95).

İnfanıl Hemanjiyom

Endotelyal hücreler ve iri çekirdekli perisitlerin küçük yuvarlak lümen etrafında bir araya gelerek oluşturdukları kapiller yapılar ile karakterizedir (97). Kapillerler, ince fibröz septa veya normal doku ile ayrılarak lobüler yapılar oluşturur.

Eozinofilili Anjiyolenfoıd Hiperplazi

Vasküler ve inflamatuvar komponentin birlikte oluşturduğu lobüle, iyi sınırlı dermal ve subkutan bir lezyondur. Bazen, genellikle bir ven karakterinde olan orta çaplı bir damardan kaynaklandığı gözlenir. Böyle olduğunda bu geniş vasküler yapıyı çevreleyen küçük kan damarları görülür. Damar duvarlarında düz kas hücreleri veya perisitler bulunur. Endotelyal hücrelerin eozinofilik sitoplazmalarının vakuolize olması tipik bir bulgudur (97).

İğsi Hücreli Hemanjiyom

Kavernöz veya genişlemiş vasküler boşluklar ve belirgin intrasitoplazmik lümenli epiteloid hücre topluluklarından oluşur (37, 98).

Kaposiform Hemanjiyoendotelyom

Klinik prezantasyonları farklıdır. Kaposiform hemanjiyoendotelyom genellikle derin yumuşak dokuda görülmekle beraber, deriyi de tutabilen, çoğunlukla çocuklarda görülen soliter bir neoplazidir (37, 98). Kaposiform hemanjiyoendotelyom lobüler büyüme paterni gösterir ve lobüllerin özellikle periferinde hemanjiyom benzeri alanlar içerir (98).

Anjiyosarkom

İyi diferansiye anjiyosarkom endotelyal hücrelerdeki atipi, hiperkromazi ve malign hücrelerin lümenine dökülmesi ile, orta derece diferansiye işsi hücreli anjiyosarkom ise belirgin atipik hücrelerin varlığı ile Kaposi sarkomundan ayrılabilir (37).

Anevrizmal Benign Fibröz Histiyositom

Psödovasküler boşluklar ve hemosiderin birikimi içeren işsi hücreli selüler bir lezyondur (37). Köpüksü makrofajlar, multinükleer dev hücrelerin varlığı ve epidermal değişiklikler ile Kaposi sarkomundan ayırt edilebilir (38).

VII-KAPOSI SARKOMUNDA TEDAVİ

Kaposi sarkomu tedavisi hastanın özelliklerine ve Kaposi sarkomunun tipine bağlı olmalıdır (23). Tedavi genellikle palyatiftir. Kaposi sarkomlu hastalarda kutanöz ve oral lezyonların cerrahi eksizyonu ile morbiditenin azaltılması, ağrı, ödem ve ülserasyonun hafifletilmesi, sistemik hastalığın ilerlemesinin yavaşlatılması tedavinin hedefleridir (39).

Transplantasyon veya iyatrojenik immünsüpresyon ile birlikte görülen Kaposi sarkomu, spesifik tedavi gerektirmeden immünsüpresif tedavi dozunun azaltılması veya sonlandırılması ile gerileyebilir.

Diğer tipler için birçok tedavi seçeneği vardır. Genel olarak sınırlı hastalık lokal tedaviler ile gerilerken, generalize veya agresif seyirli hastalık sistemik tedavi gerektirir (23). Klasik Kaposi sarkomu lokal, Afrika tipi Kaposi sarkomu sistemik tedavilere cevap verirken, AIDS-asosiyel Kaposi sarkomu lokal ve sistemik tedavileri birlikte gerektirir.

Klasik Kaposi sarkomu

Klasik Kaposi sarkomu multifokaldır ve tedaviye rağmen tekrarlayabilir (39).

Eksizyonel biyopsi: Sıklıkla tam tedavi sağlamaktadır (27, 39). Nüksler için basit eksizyonlar yeterli olmaktadır (27). Diğer yandan, hastalık zaman zaman kendiliğinden gerileyebilir ve uzun dönem tekrarlamayabilir.

Radyoterapi: Sınırlı alandaki birkaç lezyon için tek doz (8-12 Gy) şeklinde uygulanabilir (27, 39). Megavoltaj elektron tedavisi, tüm vücut yüzeyi elektron bombardımanı yapılabilir. Radyasyon tedavisi sonrası rezidü pigment kalsa da, biyopside nadiren aktif Kaposi sarkomu bulgusu görülür (39).

Sistemik tedavi: Yaygın veya tekrarlayan lezyonları olan hastalar cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi kombinasyonu veya sadece kemoterapi ile tedavi edilir. Dissemine lezyonlarda tam remisyona ulaşılabilir ve bu yıllarca sürebilir (39).

Vinblastin, bleomisin, doksorubisin, dakarbazin kemoterapide kullanılan ilaçlar arasında sayılabilir. Yapılan çalışmalarda intralezyoner ve subkutan interferon alfa-2b tedavisi de etkili bulunmuştur.

Endemik (Afrika) Kaposi sarkomu

Klasik Kaposi sarkomu tedavisinde kullanılan ilaçların endemik Kaposi sarkomunda da etkili olduğu gösterilmiştir (27).

Sitotoksik kemoteröpatikler olan vinblastin, vinkristin, bleomisin, dakarbazin, etoposid, adriyamisin, aktinomisin-D, karboksamid, CRF (rayoxane) endemik Kaposi sarkomu tedavisinde etkili ajanlardır (23).

Transplantasyon veya iyatrojenik immünsüpresyon ile birlikte görülen Kaposi sarkomu

Çoğu hastada immünsüpresyon tedavisinin azaltılması veya yeniden düzenlenmesi ile Kaposi sarkomu gerileyebilir Bu tedavi şekli böbrek transplantasyonlu hastaların yaklaşık yarısında graft kaybına neden olmaktadır (27). İmmünsüpresyon tedavisinin kesilmesi, böbrek transplantasyonlu hastalarda diyaliz tedavisi ile mümkündür. Kalp veya karaciğer transplantasyonlu hastalarda ise sadece immünsüpresif ilaç dozunun azaltılması veya yeniden düzenlenmesi söz konusudur.

Klasik Kaposi sarkomu ve AIDS-asosiyel Kaposi sarkomu tedavilerinde kullanılan ilaçlar etkili olabilir (27, 39).

AIDS-asosiyel Kaposi sarkomu

HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy): HAART tedavisiyle immünsüpresyonun düzeltilmesi, KSHV/HHV8 latent infeksiyonunu etkileyebilir (94). HAART tedavisinin Kaposi sarkomu gelişimini nasıl etkilediği tam olarak anlaşılamamıştır (39). Antiretroviral ilaç rejimlerinde tipik olarak kullanılan antiviral ilaçların KSHV/HHV8'e karşı intrensek inhibitör etkisi vardır. HAART tedavisinin, HIV ekspresyonunu azaltmasının yanısıra, immün sistemin bazı komponentleri üzerindeki olumlu etkisi yoluyla Kaposi sarkomu lezyonlarının regresyonunda aktif bir rol oynadığı sanılmaktadır (99). Bu tedavi ile Kaposi sarkomu hastalarının yaşam süreleri üzerinde anlamlı bir pozitif etki elde edilmektedir (94).

Lokal tedavi: Orta şiddette inflamatuvar cevap oluşturarak tümörün gerilemesine veya ortadan kaybolmasına yol açar (1). Lokal tedavi ile lezyonlarda etkili gerileme sağlansa da, bu tedaviler yeni lezyonların oluşması veya hastalığın yayılmasını önlemede etkili değildir (94).

- **Kriyoterapi:** Sıvı azot yüz, boyun ve ellerdeki lezyonlar için başarı ile kullanılmıştır (100).
- **Radyoterapi:** Kitle etkisi ile oluşan semptomların tedavisinde uygun tedavi seçeneğidir (1).
- **Lazer ve cerrahi tedavi:** Karbondiyoksit lazer ve fotodinamik terapi, geniş ağız mukozası lezyonlarının tedavisinde başarıyla kullanılmıştır (101). Göz kapağı,

ağız mukozası gibi zor yerlerdeki lezyonlarda lokal eksizyon yarar sağlamaktadır (1).

- İntralezyoner ve topikal kemoterapi: Kutanöz lezyonlarda intralezyoner vinblastin veya vinkristin tedavisi %60-92 oranlarında komplet ya da parsiyel klinik cevap sağlar. Kutanöz lezyonlarda retinoid reseptör panagonisti topikal alitretinoin (9-cis-retinoic acid) jel kullanılmaktadır (1).
- Deneysel tedaviler: Kaposi sarkomunun erkeklerde sık görülmesi, kadın hormonlarının koruyucu rolünü araştıran çalışmalara zemin oluşturmuştur (23). β -hCG'nin (human chorionic gonadotropin), Kaposi sarkomu hücre kültürlerinde büyümeyi ve farede metastatik Kaposi sarkomu tümörünün gelişimini önlediği saptanmıştır (102).

Sistemik tedavi: Dissemine, ilerleyici hastalığı olan veya semptomatik hastalarda sitotoksik kemoteröpatikler veya interferon- α ile tedavi gereklidir (1).

- İnterferon- α : Bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, antiviral, antiproliferatif ve antianjiyogenik etkileri ile tedavide kullanılır (94).
- Kemoterapi: Hızlı ilerleyen hastalarda, mukokütanöz hastalık varlığında, pulmoner ve semptomatik viseral tutulumu olan hastalarda kullanılır (94). Vinka alkaloidleri (vinkristin, vinblastin), bleomisin, etoposid, adriyamisin, lipozomal antrasiklinler (doksorubisin, danorubisin) ve paklitaksel kullanılan kemoteröpatiklerdir.
- Deneysel tedaviler: Bir faz II çalışmada TNF α inhibisyonu yolu ile antianjiyogenik aktivite gösteren talidomidin, antiretroviral tedavi alan 17 Kaposi sarkomlu hastada klinik etkinliği gösterilmiştir (1).
- Anjiyogenez inhibitörleri: Flt-1/KDR ile sinyal iletimini önleyen Flt-kinaz inhibitörü SU5416, doğal antianjiyogenik özelliğe sahip IM862, anjiyogenez inhibitörü TNP-470 (fumagillin) ve MMP (matrix metalloproteinase) inhibitörü COL-3 kullanılan ajanlardır (1).

ÇALIŞMADA KULLANILAN BELİRLEYİCİLER ve İN-SİTU HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER

HHV8 LNA-1 (Human Herpesvirus type 8 Latent Nuclear Antigen-1)

HHV8 LNA-1 molekülünün karboksi terminal bölümüne karşı geliştirilmiş monoklonal, sıçan kökenli bir antikordur (9).

KSHV/HHV8, viral gen ORF 73'ün ürünü olan LNA'yı kodlar (103, 104, 105). LNA, aynı zamanda v-cyc ve v-FLIP'i de kodlayan, latent olarak kontrol edilen 5.32 kb'lık bir transkript tarafından eksprese edilir (106).

HHV8 LNA-1, KSHV/HHV8 ile latent olarak infekte tüm hücrelerde viral gen ORF 73 ile kodlanan 1162 amino asit uzunluğunda (337 amino asitlik amino terminal bölüm, 585 amino asitlik hidrofilik santral bölüm, 240 amino asitlik karboksi terminal bölüm) bir proteindir (5, 10, 106). Amino ve karboksi terminal bölümü bazik amino asitlerden zengin, hidrofilik santral bölümü glutamin, glutamik asit ve asparaginin hakim olduğu multipl tekrarlayan sekanslardan oluşur (106). Bu genin, Kaposi sarkomu patogeneğinde p53 ve retinoblastom-E2F yollarını etkileyerek önemli rol oynadığı varsayılmaktadır (60).

Kellam ve ark. (106) ORF 73 karboksi terminal bölümüne karşı IFA (immunofluorescence assay), immünpresipitasyon, in-situ immünohistokimya ve FACS (fluorescence-activated cell sorting) analizleri ile dört monoklonal antikor (LN20, LN53, LN69 ve LN72) tanımlamışlardır. Sırasıyla IgM, IgG2c, IgG1 ve IgG2b immünglobulin (Ig) izotipleri olan bu dört antikor ORF 73 karboksi terminal glutatinyon S-transferaz füzyon proteinlerine karşı oluşturulmuştur. Bu antikorlardan LN53'ün parafin blok biyopsilerindeki LNA-1 antijenine karşı en reaktif ve immünohistokimyasal çalışmalar için uygun olduğu belirtilmiştir (106).

LNA proteinin immünojenik özelliği, nükleer lokalizasyonu ve latent ekspresyonu, EBV nükleer antijen (EBNAs) analogu olduğunu düşündürmektedir (106).

Anti-LNA-1 monoklonal antikor ile yapılan çalışmalar, KSHV/HHV8 infeksiyonu ile ilişkili Kaposi sarkomu, multisentrik Castleman hastalığı ve primer efüzyon lenfomasında LNA-1'in eksprese edildiğini doğrulamıştır (10, 106, 107). Kaposi sarkomunun tüm farklı morfolojik formlarında da immünohistokimyasal olarak LNA-1 saptanmıştır (10, 11).

VEGFR-3 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3)

Tirozin kinaz reseptörü VEGFR-3'e karşı geliştirilmiş sıçan kökenli monoklonal bir antikordur. VEGF reseptörleri, kan ve lenfatik damarların endotelial hücrelerinde hücre proliferasyonu, yaşaması veya diferansiyasyonunu indükleyen sinyallere aracılık eden tirozin kinazlardır. Bu sinyaller vasküler yatağın normal gelişmesi ve sürdürülmesi ile patolojik durumlarda anjiyogenez yanıtı için gereklidir (108).

Endotelial hücreler için daha spesifik olan tirozin kinaz reseptör ailesi üyesi VEGF reseptörleri, VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR) ve VEGFR-3'ten (Flt-4) oluşmaktadır (108). VEGFR-1 ve VEGFR-2 gibi VEGFR-3 de, yedi ekstraselüler immünglobulin benzeri bölüm ve kinaz aktivitesi içeren intraselüler bölüm ile karakterize Class III reseptör tirozin kinaz ailesi üyesidir (109). VEGF reseptörlerinin ligandları VEGF ailesi üyeleri olan VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasental büyüme faktörüdür.

Lenfatik endotelde eksprese edilen VEGFR-3, VEGF-C ve VEGF-D ile bağlanır ve fosforile olarak sinyal iletimine aracılık eder. VEGFR-3 ile ligandları VEGF-C ve VEGF-D lenfanjiyogenez regülasyonunda önemli rol oynar (109). VEGFR-3'ün, kısa ve uzun iki izoformu tanımlanmıştır. Bu iki izoform karboksi terminal uçta alternatif bağlanma (alternative splicing) nedeniyle ortaya çıkar (109).

VEGFR-3 başlangıçta tüm embriyonik endotelde eksprese edilir. Ancak gelişim sürecinde kan damar endotelinde ekspresyonu azalır ve yetişkin dokularda ekspresyonu sadece lenfatik endotel ile sınırlıdır (110). Yetişkinlerde, çoğu kan damar endotelinde çok az ya da hiç boyanma gözlenmezken, Kaposi sarkomu iğsi hücrelerde ve vasküler deri tümörlerinde artmış ekspresyon saptanmıştır (111, 112). VEGFR-3 ekspresyonu insan derisinde bilinen lenfatik vaskülarizasyonun dağılımı ile korelasyon gösterir.

Witmer ve ark. (108), çeşitli normal insan ve maymun dokularında epitele bitişik kapillerlerde VEGFR-1, -2 ve -3'ün birlikte lokalizasyonu, lenfoid dokudaki mikrodamarlarda VEGFR-1, -2 ve -3 ekspresyonu, beyin ve retina kapillerlerinde sadece VEGFR-1 ekspresyonu, safra kanalı ve kıl folikülü bazal membranında vasküler olmayan çözünür VEGFR-1 ekspresyonu saptamışlardır. Ultrastrüktüel seviyede VEGFR-1'in perisitlerde, VEGFR-2'nin tonsil kapiller endotelial hücrelerinde eksprese edildiği aynı yazarlar tarafından bildirilmiştir.

Ravindranath ve ark. (113), normal prostatta, benign prostat hiperplazisinde ve prostatik adenokarsinomda epitelde stromadan daha fazla olmak üzere, Valtola ve ark. (114) ise, normal meme dokusu ve fibroadenomlarda kapillerlerde zayıf, intraduktal meme

karsinomlarında tümörlü duktusların bazal laminalarına bitişik olan damarlarda belirgin VEGFR-3 ekspresyonu saptamışlardır.

İn-Situ Hibridizasyon

İn-situ hibridizasyon, işaretlenmiş komplementer nükleik asit sekansları veya probalar kullanılarak doku veya hücrelerdeki spesifik DNA veya RNA sekanslarının saptanmasını sağlayan bir yöntemdir. Probalar, hedef DNA veya RNA ile hibridize olur. Radyoaktif (P32, I125, S35, H3) veya radyoaktif olmayan (peroksidaz, biyotin, digoksinin) işaretleyicilerin proba eklenmesi ile, bu birleşme reaksiyonu görünür hale gelir. Hedef ve prob nükleik asiti hibridizasyon için tek sarmal olmalıdır. İn-situ hibridizasyonda kullanılan probalar klonlanmış RNA ve DNA problemleri veya sentetik oligonükleotid problemleridir (115).

İn-situ hibridizasyon yöntemi, virüs genomunu infekte hücrede direkt olarak belirleyebilmesi nedeniyle başlıca HPV, EBV ve HIV gibi viral infeksiyonların saptanmasında kullanılır. İn-situ hibridizasyon, latent infeksiyonları saptayabildiği gibi, HPV'de olduğu gibi çeşitli virüs subtiplerinin ayrılmasında da yararlı olabilir (115).

Kaposi sarkomunda KSHV/HHV8 genomu ilk olarak in-situ PCR (polymerase chain reaction) ile iğsi hücreler ve endotelial hücrelerde saptanmıştır (116). İn-situ hibridizasyon Kaposi sarkomu dokularında KSHV/HHV8 mRNA'nın saptanmasında kullanılır (34, 117, 118, 119).

İn-situ hibridizasyon ve PCR in-situ hibridizasyon yöntemleriyle Kaposi sarkomu iğsi ve vasküler hücrelerinde KSHV/HHV8 DNA varlığı gösterilmiştir (116, 120). İzotopik in-situ hibridizasyon yönteminde latent infeksiyon ile ilişkili olduğu gösterilen KSHV/HHV8 RNA'ya karşı geliştirilen prob ile iğsi hücrelerin büyük kısmında ve atipik damarları döşeyen endotel hücrelerinde ekspresyon saptanmıştır (34, 61).

Hedef DNA sekanslarını amplifiye eden PCR'a dayanan (116) veya radyoaktif işaretli problemlerin (120, 121) kullanıldığı in-situ hibridizasyon çalışmalarında geç dönem plak ve nodül evresi Kaposi sarkomu lezyonlarında KSHV/HHV8 viral DNA sekansları gösterilmiştir. Kaposi sarkomu lezyonlarında az sayıda virüs olduğu için, duyarlılığı yüksek in-situ hibridizasyon teknikleri gereklidir. Ancak radyoaktif işaretli problemler ile deteksiyon duyarlılığı artırılrsa da, bazı çalışmalarda, tüm Kaposi sarkomu lezyonlarında KSHV/HHV8 saptanamamıştır (120, 121).

Boshoff ve ark. (116), PCR in-situ hibridizasyon ile tüm plak ve nodül evresi Kaposi lezyonlarında KSHV/HHV8 saptamışlardır. Staskus ve ark. (34) KSHV/HHV8 T0.7 ve T1.1

sekanslarına karşı radyoaktif işaretli problar kullanarak yaptıkları çalışmada erken patch lezyon dahil tüm patch, plak ve nodül evresi Kaposi sarkomu örneklerinde T0.7 RNA saptarken, erken patch lezyonlarda T1.1 saptamamışlardır. Orenstein ve ark. (118), digoksenin işaretli T1.1 riboproblar ile Kaposi sarkomu dokularında iğsi hücre intranükleer inklüzyonlarında ve mononükleer hücrelerde KSHV/HHV8 varlığını göstermişlerdir. Bu çalışmalarda, problar infekte hücrelerde eksprese edilen litik genleri tanıdıkları için, pozitif hücre sayısı azdır (34, 118).

Son zamanlarda katalize sinyal amplifikasyon sistemi (119) ve riboproblar (117) kullanılarak yapılan in-situ hibridizasyon çalışmalarında bir çok Kaposi sarkomu iğsi hücrelerinde latent genler ORF 72 (v-cyclin D) ve ORF K12 (T0.7/kaposin) mRNA'ları saptanmıştır. Reed ve ark. (119), KSHV/HHV8 spesifik nükleik asit sekans varlığını belirlemede biyotin işaretli KSHV/HHV8 probu kullanarak patch, plak ve nodül evresi tüm Kaposi sarkomu lezyonlarında kolorimetrik hibridizasyon sinyali saptamışlardır.

MATERYEL ve METOD

Olguların Belirlenmesi

Olguların belirlenmesi amacıyla, İ. Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalının bilgisayar ortamındaki arşiv kayıtlarından yararlanıldı. Ocak 2001-Mart 2006 tarihleri arasında Kaposi sarkomu ve Kaposi sarkomu ile histopatolojik olarak ayırıcı tanıya girebilecek, çalışmada kontrol grubunda yer alması düşünülen vasküler lezyonlara ait olgular tespit edildi.

Kaposi sarkomu tanısı almış 64 olgu ve ayırıcı tanıya girebilecek 64 olguya ait rapor bilgileri ve arşiv preparatları yeniden gözden geçirilerek, doku miktarı, tespit ve takip kalitesi çalışma kapsamına uygun olan olgular belirlenmeye çalışıldı.

Yeniden değerlendirme sonunda Kaposi sarkomu tanısı almış 45, kontrol grubuna dahil edilebilecek 45 olmak üzere toplam 90 olgu belirlendi. Kaposi sarkomu grubunda dört olgudan ikişer adet olmak üzere toplam 49, kontrol grubu olgularından ise toplam 45 adet parafin blok seçilerek çalışma kapsamına alındı.

Kaposi sarkomu olgularının dördü iki ayrı evrede (2 olgu plak ve nodül, 1 olgu yama [patch] ve nodül, 1 olgu yama ve plak) olmak üzere toplam 4 yama, 13 plak ve 32 nodül evresi lezyondan oluşmaktaydı. Kaposi sarkomu ile histopatolojik olarak ayırıcı tanıya girebilecek kontrol grubu olguları 1 malign hemanjiyoendotelyom, 3 Kaposiform hemanjiyoendotelyom, 2 anjiyosarkom, 5 eozinofilili anjiyolenfoid hiperplazi, 5 Masson hemanjiyomu, 2 staz dermatiti, 6 lenfanjiyom, 4 piyojenik granülom, 6 kavernöz hemanjiyom, 2 vasküler malformasyon, 3 infantil hemanjiyom, 2 iğsi hücreli hemanjiyom, 1 mikrovenüler hemanjiyom olmak üzere 42 vasküler lezyon içermekteydi. Ayrıca Kaposi sarkomu olgularından birinin eş zamanlı nörofibrom tanısı alan, birinin ilk cerrahi girişime bağlı non-spesifik değişiklikler belirlenen tedavi sonrası reeksizyon materyeli ve daha önce Kaposi sarkomu tanısı konmuş bir olgunun post-inflamatuar nedbe dokusu saptanan eksizyon materyeli kontrol grubu içinde çalışmaya alındı.

Olguların yaş, cinsiyet, lokalizasyon, histolojik evre bilgileri patoloji raporlarından elde edildi.

Parafin Bloklardan Yeni Kesitler Hazırlanması

Belirlenen parafin bloklar arşivden çıkarıldı. Her parafin bloktan in-situ hibridizasyon ve immünohistokimyasal çalışmada kullanılmak üzere 3-5 µm kalınlığında yeni kesitler hazırlandı ve adeziv kaplı lamlar (Menzel-Glaser, Superfrost®Plus) üzerine alındı. Her vaka için ilk üçü birer, diğer üçü ise ikişer kesit içeren toplam altı adet lam hazırlandı.

Kaplı lamlar 56°C etüvde 2 saat bekletilerek kurutuldu ve kesitlerin yapışması sağlandı. Lamlar incelemelerin yapılacağı güne kadar tozsuz ortamda, oda sıcaklığında saklandı.

İmmünohistokimyasal İnceleme

Çalışmada kullanılacak primer antikorlar olan HHV8 ve VEGFR-3 için kontrol olguları kullanılarak farklı sulandırma oranları ve inkübasyon süreleri test edildi. HHV8 için 1:50 sulandırma ile 1 saat inkübasyonun, VEGFR-3 için 1:25 sulandırma ile 2 saat inkübasyonun optimal olduğuna karar verildi.

HHV8 antikoruna için standart yüksek basınçlı ısı yöntemi kullanılarak antijen unmasking işlemi gerçekleştirildi. VEGFR-3 antikoruna için antijen unmasking işlemi uygulanmadı.

HHV8 immünohistokimyasal inceleme için kullanılan üçüncü kuşak UltraVision LPValue polimer kit sistemi, hedef proteine bağlanmada ortaya çıkabilecek problemleri mümkün olduğu kadar azaltarak, daha güvenilir boyanma ve daha iyi sinyal amplifikasyonu sağlayan küçük polimer alt birimlerinden oluşmaktadır. UltraVision LPValue ile daha az antikor kullanılarak daha iyi sinyal elde edilir. UltraVision LPValue biyotin içermediğinden, biyotin işaretli konvansiyonel deteksiyon metodlarında izlenen zemin boyanması görülmez.

İmmünohistokimyasal inceleme tüm olgulara ait kesitlere 1 seansta 1 primer antikor uygulanarak gerçekleştirildi. Katlanan ve dökülen kesitler daha sonra yedek kesitler kullanılarak tamamlandı. Her çalışmada pozitif kontrol, HHV8 için pozitif olduğu bilinen bir Kaposi sarkomu olgusu, VEGFR-3 için ise plasenta dokusu kullanılarak; negatif kontrol ise primer antikor aşamasında PBS kullanılarak yapıldı.

İmmünohistokimyasal çalışmanın yapılacağı gün sırası ile aşağıdaki basamaklar uygulandı:

- Uygun koşullarda saklanmış olan kaplı lamlardan biri 56°C etüvde bir gece bekletildi.
- Etüvden çıkarılan lamlar ksilen serisinden (30 dak.) geçirilerek deparafinizasyon işlemi tamamlandı. Asetonu (5 dak.) takiben, %96'lık alkolden (15 dak.) geçirilerek distile suya kadar getirilen kesitler hidrate edildi.

- HHV8 çalışmasında bu aşamada dokudaki endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için kesitler üzerine %3'lük hidrojen peroksit damlatıldı ve 10 dak. beklendi.
- Antijen retrieval işlemi sitratlı tampon solüsyonu ve yüksek basınçlı ısı uygulanarak yapıldı. Bir litre sitrat tampon solüsyonu hazırlamak için 2.1 g sitrik asit, distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve 2M NaOH ile pH 6'ya ayarlandı.
- Bir litre sitrat tampon solüsyonu, kapağı kapalı, basınç valvi açık düdüklü tencere içinde elektrikli ısıtıcı plaka üzerinde kaynayıncaya kadar ısıtıldı. Su aşamasına getirilmiş preparatlar (HHV8 antikoru için) plastik taşıyıcılara alınarak kaynamaya başlayan tampon solüsyonu içine, kesit yüzeylerinin tamamen örtülü olmasına dikkat edilerek yerleştirildi. Düdüklü tencerenin kapağı yeniden kapatıldı. Basınç valvi bu aşamada da açık bırakıldı. Buradan tamamen su buharı çıkıncaya dek ısıtma işlemine devam edildi. Tamamen su buharı çıkışı görülünce basınç valvi kapatıldı ve 1 atmosfer basınçta 1,5 dak. daha ısıtmaya devam edildi. Düdüklü tencere ısıtıcı plaka üzerinden alınıp 20 dak. oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Bu süre sonunda basınç valvi ve kapak açılarak lamlar düdüklü tenceden çıkarılıp, distile suya alındı.
- Antijen retrieval sonrası distile suya alınan kesitlerin çevresi hidrofobik kalemle çizildi ve lamlar PBS (phosphate buffered saline, pH: 7.4) ile yıkandı.
- Antijen retrieval uygulanmayan VEGFR-3 çalışmasında distile suya alınan kesitlerin çevresi hidrofobik kalemle çizildi ve lamlar PBS (phosphate buffered saline, pH: 7.4) ile yıkandıktan sonra dokudaki endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için kesitler üzerine %3'lük hidrojen peroksit damlatıldı ve 15 dak. beklendi. Kesitler PBS ile yıkandı (5 dak.).
- Non-spesifik antikor bağlanmalarını engellemeye yönelik blokaj, anti-HHV8 antikoru için Large Volume Ultra V Block (Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA, Cat No: TA-125-UB) kullanılarak oda sıcaklığında 5 dak., anti-VEGFR-3 antikoru için Super Block (Scy Tek Lab., Logan, Utah, USA, Cat No: UHP125) kullanılarak oda sıcaklığında 15 dak. inkübasyon ile yapıldı.
- Kesitler hızlıca PBS içerisinden geçirildikten sonra, 1:50 oranında sulandırılmış monoklonal mouse anti-HHV8 antikoru ile oda sıcaklığında 1 saat, 1:25 oranında sulandırılmış monoklonal mouse anti-VEGFR-3 antikoru ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi (Tablo 3).

- Tekrar PBS ile yıkanan (2x3 dak.) kesitler, anti-HHV8 antikoru için Value Primary Antibody Enhancer (Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA, Cat No: TA-125-PBS) ile, anti-VEGFR-3 antikoru için UltraTek Anti-Polyvalent (Scy Tek Lab., Logan, Utah, USA, Cat No: UHP125) ile oda sıcaklığında 20 dak. inkübe edildi.
- Kesitler tekrar PBS ile yıkanarak (2x3 dak.), anti-HHV8 antikoru için Value HRP Polymer (Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA, Cat No: TA-125-PHS) ile, anti-VEGFR-3 antikoru için UltraTek HRP (Scy Tek Lab., Logan, Utah, USA, Cat No: UHP125) ile oda sıcaklığında 30 dak. inkübe edildi.
- Kesitler PBS ile yıkandı (2x3 dak.).
- Aminoethyl carbazole (AEC) kromojen solüsyonu (Large Volume AEC Substrat System, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA, Cat No: TA-125-HA) ile oda sıcaklığında 15 dak. inkübasyon yapıldı.
- Daha sonra kesitler distile su ile yıkanıp, Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapıldı (1.5 dak.). Kesitlerin mor renklenmesi ve distile suda kısa bir yıkamadan sonra su bazlı kapama maddesi (Aqueous-Mount, low viscosity, Scy Tek Lab., Logan, Utah, USA) damlatılarak lamelle kapatıldı.

Tablo 3: Primer Antikorlar, Sulandırma Oranları ve İnkübasyon Süreleri

Antikor	Klon	Üretici	Sulandırma Oranı	İnkübasyon Süresi ve Sıcaklığı
Monoklonal, mouse anti-HHV8	13B10	Novocastra, Newcastle, UK. Cat No: NCL-HHV8-LNA	1:50	1 saat Oda sıcaklığı (20-25°C)
Monoklonal, mouse anti-VEGFR-3	KLT9	Novocastra, Newcastle, UK. Cat No: NCL-L-VEGFR-3	1:25	2 saat Oda sıcaklığı (20-25°C)

İn-Situ Hibridizasyon

İn-situ hibridizasyon yöntemi hücredeki spesifik nükleik asit sekanslarının gösterilmesini sağlamaktadır. Formalinde tespit edilmiş parafin dokulardaki RNA'nın saptanması için kullanılabilen oligonükleotid problarla, immünohistokimyasal yöntemden farklı olmayan basamaklar kullanılarak gerçekleştirilen bu yöntemin uygulanması oldukça kolaydır.

Çalışmada kullanılacak Proteinaz K ve deteksiyon aşamasının 2. basamağındaki tavşan F(ab) anti-FITC/AP (alkalen fosfataz) antikorunun optimal konsantrasyonunu belirlemek için bir Kaposi sarkomu kontrol olgusu kullanılarak farklı konsantrasyonlar test edildi. Proteinaz K 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 15 µg/ml, tavşan F(ab) anti-FITC/AP antikoruna ise 1:100 ve 1:200 konsantrasyonlarda test edildi. Proteinaz K için 10 µg/ml, tavşan F(ab) anti-FITC/AP antikoruna için 1:100 konsantrasyonun optimal olduğuna karar verildi.

Kesitler deparafinize ve rehidrate edildikten sonra 37°C'de 30 dakika süreyle Proteinaz K ile muamele edildi. İnfekte hücrelerin çekirdeklerinde biriken T1.1 mRNA olarak nitelendirilen küçük bir transkripte karşı hazırlanmış, fluorescein (FITC) ile konjuge edilmiş oligonükleotid prob kokteylinden oluşan NCL-HHV8 probu ile 37°C'de 2 saat süre ile inkübasyon yapılarak hibridizasyon aşaması tamamlandı. Bağlanmış olan probun, anti-FITC/AP antikoruna 25°C'de 30 dakika uygulanarak işaretlenmesi sağlandı. Enzim substratı ve levamizol ile 25°C'de bir gece karanlıkta inkübasyon sonrası sinyallerin dağılımı saptandı.

Ana hatlarıyla ifade edilen yöntemin ayrıntıları aşağıdaki paragraflarda verilmektedir.

Örneklerin Hazırlanması:

- Uygun koşullarda saklanmış kaplı lamlardan, her seans için belirlenen olgulara ait birer lam alınarak 56°C etüvde bir gece bekletildi.
- Etüvden çıkarılan lamlar ksilen serisinden (30 dak.) geçirilerek deparafinizasyon işlemi tamamlandı. %99 v/v etanol (10 dak.) ve %95 v/v etanolden (5 dak.) geçirilerek deiyonize suya (3 dak.) kadar getirilen kesitler hidrate edildi.
- Kesitler inkübasyon kutusuna yerleştirilerek 0,05 M Tris/HCl pH 7,6 ile sulandırılmış 10 µg/ml konsantrasyonda 100 µl Proteinaz K (Novocastra, Newcastle, UK., Cat No: NCL-PK) ile 37°C'de 30 dak. inkübe edildi.
- Deiyonize su (5 dak.), %95 v/v etanol (5 dak.) ve %99 v/v etanolden (5 dak.) geçirilen lamlar havada kurutuldu (5-7 dak.).

Hibridizasyon:

- Lamlar üzerine 15-20 µl fluorescein ile konjuge edilmiş HHV8 prob hibridizasyon solüsyonu (Novocastra, Newcastle, UK., Cat No: NCL-HHV8) konularak lamelle kapatıldı. Denatürasyon ve endojen alkali fosfataz aktivitesinin blokajı amacıyla 15 dak. 65°C'lik etüvde bekletildi. Hemen ardından 37°C etüvde 2 saat inkübasyon ile hibridizasyon gerçekleştirildi.

- Lameller eğimle bir beher içine akıtılarak kesitlerin açılması sağlandı ve lamalar %0,1 v/v Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany, Cat No: T 9284) içeren TBS (Scy Tek Lab., Logan, Utah, USA, 25X solution, Cat No: TBS125) solüsyonunda (5+5 dak.) yıkandı.

Deteksiyon:

- Non-spesifik bağlanmaları önlemek için %3 ağırlık/hacim (w/v) BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany, Cat No: B 4287) ve %0,1 v/v Triton X-100 içeren TBS ile 1:5 oranında sulandırılmış normal tavşan serumundan (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany, Cat No: R 4505) oluşan blok solüsyonu her kesite 100 µl damlatılarak 10 dak. inkübe edildi.
- Blok solüsyonunun fazlası silkelenerek uzaklaştırıldı ve %3 w/v BSA ve %0,1 v/v Triton-X-100 içeren TBS solüsyonu ile sulandırılmış alkali fosfataz ile konjuge edilmiş tavşan F(ab) anti-FITC/AP antikoruyla (Novocastra, Newcastle, UK., Cat No: NCL-ISH-D) (Vial A) 30 dak. inkübe edildi.
- TBS ile (5 dak.) ve ardından alkali fosfataz substrat tamponu pH 9.0 ile (5 dak.) kesitler yıkandı.
- İnkübasyon kutusuna alınan kesitlere alkali fosfataz substrat tamponu ile 1:50 oranında sulandırılmış Vial B (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate [BCIP] ve Nitroblue tetrazolium [NBT]) (Novocastra, Newcastle, UK., Cat No: NCL-ISH-D) içeriğinin her ml'si için 1 µl Vial C (levamizol) (Novocastra, Newcastle, UK., Cat No: NCL-ISH-D) içeriği eklenmesi ile elde edilen solüsyondan 100 µl damlatıldı ve lamelle kapatıldı. Oda sıcaklığında karanlıkta 1 gece inkübe edildi.
- Ertesi gün akar suda 5 dak. yıkanarak deiyonize sudan geçirildi.
- Mayer hematoksilen ile zıt boyama (10 saniye gibi çok kısa süre) yapıldı.
- Su bazlı kapatma maddesi (Aqueous-Mount, low viscosity, Scy Tek Lab., Logan, Utah, USA) damlatılarak lamelle kapatıldı.

İn-situ hibridizasyonda kullanılan tampon ve sulandırma solüsyonlarının hazırlama yöntemleri Ek 1'de verilmektedir.

İnceleme için gerekli olan 37°C'lik etüv için Tıbbi Biyoloji AD laboratuvarı olanaklarından yararlanıldı.

İn-situ hibridizasyon 6 seansta gerçekleştirildi. Katlanan ve dökülen kesitler bir sonraki seansta yedek kesitler kullanılarak tamamlandı.

Ek 1: Tampon ve Sulandırma Solüsyonları Hazırlama Yöntemi

Tris solüsyonu (0,05 M Tris/HCl pH 7.6):

Proteinaz K rekonstitüsyonu ve sulandırılması için gerekli olan bu solüsyonun hazırlanması:

* 0,6057 gram Tris (M:121,14 g/mol, C₄H₁₁NO₃, Charge/lot K21570687 744, Merck) deiyonize su ile karıştırıldı. Pastör pipeti ile HCl eklenerek pH 7,6'a ayarlandı ve deiyonize su ile 100 ml'e tamamlandı.

TBS + %0,1 v/v Triton X-100 solüsyonu:

Hibridizasyon aşaması sonunda yıkama için kullanılan bu solüsyonun hazırlanması:

* 249,75 ml TBS+0,25 ml Triton X-100 karıştırılır.

TBS + %0,1 v/v Triton X-100 + %3 w/v BSA (Bovine serum albumin) solüsyonu:

Deteksiyon aşamasının 1. basamağında normal tavşan serumunun 1:5 oranında sulandırılmasında (blok solüsyonu) ve deteksiyon aşamasının 2. basamağında tavşan F(ab) anti-FITC/AP antikorunun (Vial A) 1:100 sulandırılmasında kullanılan bu solüsyon her seansta çalışılan olgu sayısına bağılı olarak değışen miktarlarda çalışma gününde hazırlandı. TBS + %0,1 v/v Triton X-100 solüsyonunun her 1 ml'si için 30 mg BSA eklendi.

Alkali Fosfataz Substrat Tamponu solüsyonu (100 mM TrisHCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl pH 9.0):

Deteksiyon aşamasının 3. basamağında yıkama ve 4. basamağında Vial B içeriğini 1:50 sulandırmak için kullanılan bu solüsyonun hazırlanması:

* 1,2114 gram Tris, 1,0165 gram MgCl₂ (M:203,31 g/mol, MgCl₂-6H₂O, Merck), 0,5844 gram NaCl (M:58,44 g/mol, NaCl, Charge/lot K34684504 520, Merck) deiyonize su ile karıştırıldı. Pastör pipeti ile HCl eklenerek pH 9'a ayarlandı ve deiyonize su ile 100 ml'e tamamlandı.

Değerlendirme

Her olguya ait arşivden alınan H.-E. boyalı preparatlar ile in-situ hibridizasyon ve 2 farklı primer antikor ile boyanan preparatlar birlikte değerlendirildi. İmmünohistokimyasal reaksiyonun değerlendirilmesi hücrelerin boyanma yüzdesi ve boyanma şiddeti dikkate alınarak gerçekleştirildi. Boyanma yaygınlığı hücrelerin %0, 1-5, 6-25, 26-50, 51-75, 76-100 olarak, boyanma şiddeti ise (+) zayıf, (++) orta, (+++) kuvvetli olarak derecelendirildi. Bu kategorilere bir puan değeri verilerek oluşturulmuş bir skora tablosundan yararlanılarak (Tablo 4), incelenen her kesit için bir immünreaktivite skoru elde edildi. İn-situ hibridizasyon incelemenin değerlendirilmesi ise sadece boyanma yaygınlığı ile yapıldı.

Tablo 4: İmmünreaktivite Değerlendirmesinde Kullanılan Skorlama Tablosu

	Boyanma şiddeti	+	++	+++
Boyanma yaygınlığı (%)	Puan			
0	0	0	0	0
1-5	1	1	2	3
6-25	5	5	10	15
26-50	10	10	20	30
51-75	15	15	30	45
76-100	20	20	40	60

Değerlendirme iki aşamalı olarak yapıldı. İlk değerlendirme bir gözlemci (E.K.), ikinci değerlendirme ise iki gözlemci (E.K.+N.B.) tarafından birlikte yapıldı. Mikroskopik incelemede Olympus BX51 ışık mikroskobu kullanıldı. Nikon E4500 dijital kamera kullanılarak, 1024x768 piksel alan ve yüksek rezolüsyon modunda fotoğrafı yapıldı.

İstatistiksel değerlendirme olarak, iki gözlemci arasında uyum olup olmadığını araştırmak amacıyla non-parametrik testlerden Wilcoxon signed rank test, gruplar arası anti-VEGFR immünreaktivite skorlarını karşılaştırmak için Mann Whitney U testi, Kaposi sarkomu olgularının evrelerine göre karşılaştırılması için Kruskal-Wallis testi, primer antikorların duyarlılık, özgüllük ve doğruluk oranlarını hesaplamak için medikal tanı testleri kullanıldı. Testler SPSS programıyla (SPSS 10.0 for Windows) bilgisayar ortamında yapıldı.

BULGULAR

Olguların Klinik Özellikleri

Çalışma kapsamına alınan 90 olgu içinde 45 Kaposi sarkomu, kontrol grubunda Kaposi sarkomu ile histopatolojik olarak ayırıcı tanıya girebilecek 42 vasküler lezyon, birer olgu halinde de Kaposi sarkomu ile eş zamanlı eksize edilen nörofibrom, Kaposi sarkomu hastasında tedavi sonrası reeksizyon dokusu ve yine bir Kaposi sarkomu hastasında nedbe dokusu mevcuttu. Bu olgulardan Kaposi sarkomu hastalarına ait klinik parametreler Tablo 5'te, kontrol grubu hastalarına ait parametreler ise Tablo 6'da gösterilmektedir.

Kaposi sarkomu olgularından 31 olgu (%69) klasik tip, 12 olgu (%26,6) transplantasyon veya iyatrojenik immünsüpresyon ile birlikte görülen tip, 2 olgu (%4,4) AIDS-asosiyeye tipten oluşmaktaydı.

Yaş, Cinsiyet ve Lokalizasyon

Kaposi sarkomu olgularının yaşları erkeklerde 21 ile 97, kadınlarda 3 ile 78 arasında değişmekteydi. Yaş ortalaması $59,53 \pm 17,91$ (mediyan 60) olup, erkeklerde $59,46 \pm 16,67$ (mediyan 59,5), kadınlarda $59,65 \pm 20,33$ (mediyan 65) olarak hesaplandı. Kaposi sarkomu olgularının 28'i (%62,2) erkek, 17'si (%37,8) kadındı. İki farklı dönem lezyonu incelemeye alınan 2 olgudan birinde lezyonlar ağız mukozası ve üst ekstremitte, diğerinde göğüs ve alt ekstremitte yerleşimliydi. Diğer 43 olguda ise lezyonların vücut dağılımı şöyleydi: 28 olgu (%65,1) alt ekstremitte, 5 olgu (%11,6) üst ekstremitte, 4 olgu (%9,3) baş-boyun, 2'şer olgu (%4,7) gövde ve penis, 1'er olgu (%2,3) ağız mukozası ve lenf gangliyonu.

Klasik Kaposi sarkomu olgularının yaşları 3 ile 97 arasında değişmekte olup, erkek:kadın oranı 2,4:1 idi. Klasik Kaposi sarkomunda lezyonlar 21 olguda (%67,8) alt ekstremitte, 4 olguda (%13) baş-boyun, 2'şer olguda (%6,4) üst ekstremitte, gövde ve penis yerleşimliydi. HIV pozitifliğinin eşlik ettiği iki erkek hastada lezyonlar üst ekstremitte yerleşimliydi.

Transplantasyon veya iyatrojenik immünsüpresyon ile birlikte görülen Kaposi sarkomu olgularının yaşları 34 ile 78 arasında değişmekte olup, erkek:kadın oranı 1:2 idi. Lezyonlar 7 olguda (%58,5) alt ekstremitte, 1 olguda (%8,3) ağız mukozası ve üst ekstremitte, 1 olguda

(%8,3) göğüs ve alt ekstremiteler, 1'er olguda (%8,3) ağız mukozası, üst ekstremiteler ve lenf gangliyonu yerleşimliydi.

Çalışmada kontrol grubunu oluşturan olguların yaşları 1 ile 81 arasında değişmekteydi. Yaş ortalaması $37,33 \pm 22,77$ (mediyan 35) olarak hesaplandı. Kontrol grubunu oluşturan olguların 23'ü (%51,1) kadın, 22'si (%48,9) erkekti. Lokalizasyon olarak 17 olgu (%39,6) ile baş-boyun ilk sırada olup, bunu 12 olgu (%27,9) ile üst ekstremiteler, 11 olgu (%25,6) ile alt ekstremiteler, 1'er olgu (%2,3) ile abdomen, gövde ve sol meme izlemekteydi. İki olgunun lokalizasyon bilgisine ulaşamadı.

Kaposi sarkomu ve kontrol grubu olgularının yaş ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($t=5,14$, $p=0,0005$). Her iki grupta da cinsiyet dağılımı homojendir ($\chi^2=1,62$, $p=0,203$). Kaposi sarkomu olgularında ($t=0,03$, $p=0,974$) ve kontrol grubunu oluşturan olgularda ($t=1,64$, $p=0,109$) cinsiyete göre yaş ortalamaları farklılık göstermemektedir.

Evre

Kaposi sarkomu olgularından dördünde iki ayrı evrede lezyon mevcuttu: 1 olguda yama ve plak, 1 olguda yama ve nodül, 2 olguda plak ve nodül olmak üzere, tüm grup toplam 4 (%8,2) yama, 13 (%26,5) plak ve 32 (%65,3) nodül evresi lezyondan oluşmaktaydı.

Öykü

Kaposi sarkomu olgularına ait patoloji raporları incelendiğinde, 4 olguda organ transplantasyonu (1 karaciğer, 2 böbrek, diğer hasta bilinmiyor), 4 olguda (2 myastenia gravis, 1 pemfigoid, 1 pemfigus vulgaris) sistemik steroid tedavisi, 1 olguda ise immünsüpresyon tedavisi gibi özellikler bulunduğu saptandı. İki olguda da HIV pozitifliği mevcuttu.

Kaposi sarkomlu olguların üçünde hematolojik malignite olduğu belirlendi. Bunlardan üç yıl önce kemik iliği biyopsisinde B hücreli lenfoma infiltrasyonu saptanmış olan 45 no'lu vakanın çalışmamızda değerlendirilen lenf gangliyonunda Kaposi sarkomunun yanısıra diffüz büyük B hücreli lenfoma mevcuttu. Kronik lenfositik lösemi (KLL) ve B hepatitine bağlı dekompanse karaciğer sirozu ile izlenen 2 no'lu vakanın deri biyopsisinde Kaposi sarkomu ile birlikte KLL ile uyumlu lenfoid infiltrasyon mevcuttu. Bir yıl önce büyük B hücreli lenfoma

tanısı ile 8 kür kemoterapi almış olan 6 no'lu olgunun, deri lezyonu dışında lenfoma tanısı aldığı inguinal lenf gangliyonunda da hiler bölgede Kaposi sarkomu bulunduğu saptandı.

Bunlar dışında B hepatitine bağlı siroz nedeniyle karaciğer transplantasyonu yapılan 33 no'lu olguda gingivadaki ülseröz lezyonun yanısıra, mediastinal, hiler ve batın lenfadenopatileri ile karaciğerde multipl kitleleri mevcuttu. Bu olguda karaciğerden alınan tru-cut biyopside de Kaposi sarkomu ile uyumlu bulgular saptandı.

Üç yaşındaki 16 no'lu olguda deride sağ inguinal bölgede Kaposi sarkomunun yanısıra yaygın lenfadenopatiler ve pansitopeni saptandı. Klinik prezantasyonu ile endemik Kaposi sarkomu kuşkusu uyandıran bu olgu, konjenital veya edinsel immünsüpresyon olasılığı ve HIV pozitifliği açısından araştırıldı. Fatal seyreden olgu, immünsüpresyon olmaması ve yaşadığı bölgenin Akdeniz havzası olması nedeniyle, klinik değerlendirmede klasik Kaposi sarkomu olarak kabul edildi.

Tablo 5: Kaposi Sarkomu Olgularının Klinik Özellikleri

	Protokol No	Yaş	Cinsiyet	Lokalizasyon	Evre	Öykü
1	1759-01	65	K	Ön kol	Plak	Myastenia gravis tanısı ile 4 senedir steroid tedavisi alıyor.
	4373-01	65	K	Dil	Nodül	
2	12078-01	78	K	Sağ alt ekstremitte	Plak	HBV'ye bağlı KC sirozu, KLL infiltrasyonu.
3	19254-01	97	E	Ayak bileği iç malleol çevresi	Nodül	
4	23281-01	74	K	Göğüs	Plak	Pemfigoid nedeniyle 3 aydır steroid tedavisi alıyor.
	23281-01	74	K	Ayak	Nodül	
5	25781-01	78	E	Sol ayak sırtı	Nodül	
6	31307-01	61	E	İnguinal bölge	Nodül	1 yıl önce büyük B hücreli lenfoma 8 kür KT (COPP).
7	3544-02	50	E	Penis üretral mea	Nodül	
8	5523-02	54	E	Ayak	Nodül	
9	5610-02	72	E	Sol ayak	Nodül	
10	13075-02	44	E	Sağ diz mediyali	Nodül	4 yıl önce renal transplantasyon yapılmış.
11	18000-02	70	E	Sağ ayak parmak arası	Nodül	1994'den beri Kaposi sarkomu.
12	21135-02	34	E	Sağ alt bacak	Plak	Transplant hastası.
13	25960-02	65	E	Abdomen	Plak	
14	26205-02	83	E	Sağ ön kol distali	Nodül	
15	30835-02	72	E	Sol ayak	Patch	
16	1630-03	3	K	Sağ inguinal bölge	Nodül	
17	3205-03	46	E	Tibia ön yüz	Patch	
	3205-03	46	E	Tibia ön yüz	Plak	
18	8643-03	58	E	Sağ bacak	Nodül	
19	21254-03	60	K	Alt ekstremitte	Plak	
20	26484-03	60	E	Sağ ayak sırtı	Plak	
21	29315-03	75	K	Sternum	Nodül	
22	30238-03	76	K	Sol ayak sırtı	Plak	
23	1009-04	60	E	Mental bölge	Nodül	
24	15413-04	75	K	Sol el dış kenar	Nodül	Myastenia gravis nedeni ile steroid tedavisi alıyor.
25	22493-04	71	E	Ayak dış yan kısım	Plak	
26	25799-04	40	K	Sol alt bacak	Nodül	İmmünsüpresyon tedavisi alıyor. Nedeni?
27	31732-04	58	E	Sol alt ekstremitte posteriyoru	Nodül	Pemfigus vulgaris nedeniyle 8 aydır steroid tedavisi alıyor.
28	8058-05	64	E	Sol ayak sırtı	Nodül	
29	8471-05	44	K	Sağ boyun	Nodül	
30	9032-05	76	K	Sağ ön kol	Nodül	
31	12339-05	56	E	Penis	Nodül	
32	12432-05	27	E	Kol	Plak	HIV (+).
33	16224-05	45	K	Gingiva	Nodül	2004'de karaciğer transplantasyonu, LAP'lar.
34	19473-05	52	E	Sağ nazolabiyal bölge	Nodül	
35	19791-05	78	K	Sağ bacak gastroknemius	Nodül	
36	23020-05	76	K	Sol ayak sırtı	Patch	
	23020-05	76	K	Sol ayak sırtı	Nodül	
37	23228-05	57	K	Sağ bacak ön yüz	Nodül	
38	23811-05	79	E	Sağ ayak tabanı	Nodül	
39	30988-05	46	K	Sol bacak	Plak	1994'te renal transplantasyon.
40	31668-05	59	E	Ayak tabanı	Nodül	
41	32327-05	73	E	Sol ayak aşil tendonu, bilek laterali	Plak	Daha önce Kaposi sarkomu nedeniyle tedavi almış.
42	36603-05	21	E	Sol ayak	Nodül	
43	6353-06	56	E	Sağ kulak	Nodül	
44	6449-06	45	E	Sağ omuz	Patch	HIV (+).
45	9384-06	46	K	Lenf gangliyonu	Nodül	Büyük B hücreli lenfoma.

Tablo 6: Kontrol Grubu Olgularının Klinik Özellikleri

Tanı		Protokol No	Yaş	Cinsiyet	Lokalizasyon
Malign hemanjiyoendotelyom	1	15734-04	57	E	Sol kulak arkası
Kaposiform hemanjiyoendotelyom	2	25543-01	1	E	Sol uyluk
	3	2248-03	11	K	Aksilla, ön kol
	4	11039-04	30	K	Sol ön kol dorsal yüz
Anjiyosarkom	5	25369-03	63	K	Sağ yanak
	6	11989-04	35	K	Sol meme
Eozinofilili anjiyolenfoid hiperplazi	7	28898-01	16	E	Sağ temporal
	8	22744-02	43	E	Sağ kulak kepeçesi arkası
	9	25544-03	21	K	Sol göz kapağı
	10	6198-04	32	K	Sağ kulak
Masson hemanjiyomu	11	18264-04	30	K	Sol preauriküler
	12	4555-03	12	E	Sağ bacak lateral yüz
	13	15000-03	59	E	Sağ el 3. parmak
	14	21580-03	44	K	Parmak volar yüz
	15	28535-03	34	K	Avuç içi
	16	14109-04	26	K	Sol uyluk ön yüz
Staz dermatiti	17	32305-03	70	E	Sol bacak 1/3 alt dış yan
	18	28755-05	33	E	Bacak
Lenfanjiyom	19	21320-01	22	E	Sol aksiller bölge
	20	22957-01	13	K	Sol uyluk
	21	26984-01	11	E	Sağ inguinal bölge
	22	10309-02	22	K	Lokalizasyonu bilinmiyor
	23	415-04	1	K	Sol göğüs duvarı
	24	3283-05	74	K	Sağ kruris distal 1/3 posterior
Piyojenik granülom	25	6674-04	49	E	El parmak ucu
	26	27799-04	53	K	Sağ dirsek ön yüz
	27	30339-04	60	E	Karın duvarı
	28	823-05	30	E	Alt dudak
Kavernöz hemanjiyom	29	29003-01	40	E	Sol orbita
	30	20123-03	30	E	Sol orbita
	31	33620-03	56	E	Alın
	32	23574-04	43	E	Yüz
	33	29195-04	36	E	Boyun sağ laterali
	34	1162-05	80	E	Boyun
Vasküler malformasyon	35	22828-01	51	K	Sağ omuz
	36	27456-04	36	K	El
İnfanıl hemanjiyom	37	6896-04	2	K	Alın
	38	12526-04	1	K	Üst göz kapağı
	39	2478-06	7	K	Burun
İğsi hücreli hemanjiyom	40	4175-06	36	E	Lokalizasyonu bilinmiyor
	41	7905-93	45	K	Sol el
Mikrovenüler hemanjiyom	42	16975-06	30	K	Sağ femoral iç kısım
Nörofibrom	43	29315-03	75	K	Sağ omuz
Post-operatif değişiklikler	44	27821-05	79	E	Ayak
Post-inflamatuar nedbe dokusu	45	9856-05	81	E	Alt ekstremitte distali

İmmünohistokimyasal Bulgular

Değerlendirme iki aşamalı olarak yapıldı. Her iki değerlendirmede aynı metodoloji ve sıra izlendi. İki gözlem arasında uyum olup olmadığı, immünohistokimyasal yöntem ile uygulanan HHV8 ve VEGFR-3 için Wilcoxon signed rank testi kullanılarak araştırıldı. Wilcoxon signed rank testi ile iki gözlem arasında HHV8 ($z=1,79$, $p=0,072$) ve VEGFR-3 ($z=1,55$, $p=0,122$) değerlendirmesinde anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı. İn-situ hibridizasyon yöntemi ile uygulanan HHV8 incelemesinde ise iki gözlemden de aynı sonuçlarla tam uyum elde edildiğinden, bu yöntem için gözlemler arası karşılaştırma yapılmadı.

Bu sonucun elde edilmesinden sonra iki gözlemcinin birlikte yapmış oldukları değerlendirmede kaydedilen immünoreaktivite skorları esas kabul edildi (Tablo 7 ve 8) ve antikorlar arası karşılaştırmalar bu verilere dayanılarak yapıldı.

Kaposi sarkomu ve kontrol grubunda HHV8 ve VEGFR-3 antikorları ile saptanan immünoreaktivite yaygınlığı ve şiddeti, sırasıyla Tablo 7 ve 8'de gösterilmektedir.

Human Herpesvirus 8 (HHV8)

Anti-HHV8 antikorunu kullanılarak yapılan incelemede Kaposi sarkomu olgularının tümünde (%100) immünoreaktivite saptandı. İmmünoreaktivite tümöral hücrelerde çekirdek reaktivitesi biçimindeydi. Nodül evresi lezyonlarda immünoreaktivite içi hücrelerde saptanırken, patch ve plak döneminde yarıklar tarzındaki patolojik damarları döşeyen endotel hücrelerde izlenmekteydi.

İki farklı dönem lezyonu incelemeye alınan 4 Kaposi sarkomu olgusunda, 1 no'lu olgunun plak evresinde 6-25/++ [10], nodül evresinde 51-75/+++ [45], 4 no'lu olgunun plak ve nodül evrelerinde sırasıyla 51-75/++ [30] ve 6-25/+ [5], 17 no'lu olgunun yama (patch) ve plak evrelerinin her ikisinde 51-75/++ [30], 36 no'lu olgunun yama (patch) ve nodül evrelerinin her ikisinde 1-5/+ [1] immünoreaktivite saptandı.

Kaposi sarkomu olgularının immünoreaktivite skorlarında evreler arası karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla her evre için ortalama skor elde edildi. Ortalama skor, yama (patch) evresinde $37,75 \pm 28,28$, plak evresinde $17,84 \pm 14,02$, nodül evresinde ise $33 \pm 16,97$ olarak belirlendi. Ortalama skor sonuçlarına göre evrelerin Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırılmasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Kontrol grubundaki vasküler lezyonların hiçbirinde immünreaktivite saptanmadı. Kaposi sarkomu ile eş zamanlı olarak farklı bir vücut bölgesinden eksize edilen nörofibromda ve 2 Kaposi sarkomu hastasında nedbe dokusunda immünreaktivite görülmedi.

Medikal tanı testleri ile anti-HHV8 için duyarlılık, özgüllük ve doğruluk oranları %100 olarak hesaplandı.

Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 (VEGFR-3)

Anti-VEGFR-3 antikoru kullanılarak yapılan incelemede Kaposi sarkomu olgularının 24'ünde (%53,3) pozitif immünreaktivite belirlendi. Kaposi sarkomu olguları arasında immünreaktivite yama (patch) evresi olguların 2'sinde (%50), plak evresi olguların 5'inde (%38,5), nodül evresi olguların 18'inde (%56,3) belirlendi. İmmünreaktivite tümöral hücrelerde sitoplazma reaktivitesi biçimindeydi.

İki farklı dönem lezyonu incelemeye alınan 4 Kaposi sarkomu olgusunda, 1 no'lu olgunun sadece nodül evresinde 51-75/++ [30], 4 no'lu olgunun sadece plak evresinde 1-5/+ [1], 17 no'lu olgunun yama (patch) ve plak evrelerinin her ikisinde 6-25/+ [5] immünreaktivite belirlenirken, 36 no'lu olgunun yama (patch) ve nodül evrelerinin her ikisinde de immünreaktivite görülmedi.

Kontrol grubundaki olguların 28'inde (%62,2), vasküler lezyonların 26'sında (%61,9) immünreaktivite saptandı. Medikal tanı testleri ile anti-VEGFR-3 için duyarlılık, özgüllük ve doğruluk oranları sırasıyla %53,3, %37,8 ve %45,5 olarak hesaplandı.

Kaposi sarkomu olgularının kontrol grubunu oluşturan olgularla VEGFR-3 skorları açısından Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmasında iki grup arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($z=35$, $p=0,720$).

Lenfanjiyom olguları ile diğer vasküler lezyonlar ($z=0,54$, $p=0,589$) ve Kaposi sarkomu olguları ($z=0,10$, $p=0,920$) arasında VEGFR-3 değerleri bakımından Mann Whitney U testi ile yapılan karşılaştırmada her iki grup için de istatistiksel anlamlı farklılık görülmedi.

Anti-VEGFR-3 antikoru ile tümör hücreleri ile birlikte ya da tümör hücrelerinde immünreaktivite izlenmeden sadece hemosiderinli makrofajlar, histiyositler, plazma hücreleri, mast hücreleri, stromal fibroblastlar, yağ ve ekrin ter bezlerinde, damar düz kası hücrelerinde, çizgili kas liflerinde, meme lobulusu normal duktal hücrelerde immünreaktivite gözlemlendi.

Kaposi Sarkomu Olgularında HHV8 ve VEGFR-3 Ekspresyonunun Karşılaştırılması

Erken evre yama (patch) ve plak lezyonlarında belirlenen VEGFR-3 eksprese eden hücre yüzdesi, HHV8 eksprese eden hücre yüzdesinden daha düşük oranlardaydı. Nodüler evre lezyonlarda ise VEGFR-3 eksprese eden hücre yüzdesi 3 olguda aynı, 5 olguda daha yüksek, 10 olguda ise daha düşüktü.

HHV8 İn-Situ Hibridizasyon Sonuçları

İn-situ hibridizasyon yönteminde Kaposi sarkomu olgularının 29'unda (%64,4) pozitif reaktivite belirlendi. Sinyal dağılımı çekirdek reaktivitesi biçimindeydi. Kaposi sarkomu olguları arasında en yoğun reaktivite 45 no'lu olguda gözlemlendi. Ancak bu olguda bile hücrelerin sadece %1'inde reaktivite saptanırken, diğer tüm pozitif olgularda bu oran %1'in altındaydı.

Farklı dönem lezyonları ile incelemeye alınan 4 Kaposi sarkomu olgusundan, 1 ve 4 no'lu olguların her iki evresinde de <1 reaktivite belirlenirken, 17 ve 36 no'lu olguların her iki evresinde de reaktivite görülmedi. Bu olgularda, in-situ hibridizasyon sonuçları dönemler arası farklılık göstermemektedir.

Kaposi sarkomu plak evresindeki iki olguda birkaç iğsi hücrenin yanısıra, 1 no'lu olguda kıl folikülü ve ekrin ter bezi epitel hücrelerinde, 12 no'lu olguda ise ekrin ter bezinde de reaktivite saptandı.

Kontrol grubu vasküler lezyonlarında bir olgu dışında reaktivite görülmedi. Masson hemanjyomlu 12 no'lu bu olguda ekrin ter bezi hücrelerinde ve epidermiste fokal reaktivite saptanmakla birlikte, lezyonu oluşturan hücrelerde reaktivite gözlenmedi.

Medikal tanı testleri ile duyarlılık, özgüllük ve doğruluk oranı sırasıyla %64,4, %97,8 ve %81,1 olarak hesaplandı.

HHV8 Pozitifliği Açısından İmmünohistokimyasal Yöntem ve İn-Situ Hibridizasyon Sonuçlarının Karşılaştırılması

İmmünohistokimyasal inceleme ile Kaposi sarkomu olgularının tümünde (%100) immünreaktivite elde edilirken, in-situ hibridizasyon ile olguların sadece 29'unda (%64,4) pozitif reaksiyon saptandı.

Tablo 7: Kaposi Sarkomu Olgularında İmmünreaktivite Skorları ve İn-situ Hibridizasyon Sonuçları*

	Protokol No	Evre	HHV8 %/şiddet [puan]	VEGFR-3 %/şiddet [puan]	İSH HHV8 (%)
1	1759-01	Plak	6-25/++ [10]	0/- [0]	<1
	4373-01	Nodül	51-75/+++ [45]	51-75/++ [30]	<1
2	12078-01	Plak	6-25/+ [5]	0/- [0]	<1
3	19254-01	Nodül	51-75/++ [30]	0/- [0]	0
4	23281-01	Plak	51-75/++ [30]	1-5/+ [1]	<1
	23281-01	Nodül	6-25/+ [5]	0/- [0]	<1
5	25781-01	Nodül	76-100/+++ [60]	1-5/+ [1]	<1
6	31307-01	Nodül	76-100/++ [40]	0/- [0]	<1
7	3544-02	Nodül	76-100/+++ [60]	0/- [0]	<1
8	5523-02	Nodül	76-100/++ [40]	6-25/+ [5]	<1
9	5610-02	Nodül	51-75/+++ [45]	26-50/+ [10]	<1
10	13075-02	Nodül	26-50/+++ [30]	51-75/++ [30]	0
11	18000-02	Nodül	51-75/++ [30]	51-75/+ [15]	<1
12	21135-02	Plak	51-75/+ [15]	26-50/+ [10]	<1
13	25960-02	Plak	51-75/++ [30]	6-25/+ [5]	0
14	26205-02	Nodül	76-100/+++ [60]	76-100/+ [20]	<1
15	30835-02	Patch	76-100/+++ [60]	51-75/++ [30]	0
16	1630-03	Nodül	6-25/++ [10]	51-75/+ [15]	0
17	3205-03	Patch	51-75/++ [30]	6-25/+ [5]	0
	3205-03	Plak	51-75/++ [30]	6-25/+ [5]	0
18	8643-03	Nodül	51-75/+++ [45]	76-100/+ [20]	<1
19	21254-03	Plak	51-75/+++ [45]	6-25/+ [5]	0
20	26484-03	Plak	6-25/+ [5]	0/- [0]	<1
21	29315-03	Nodül	51-75/++ [30]	0/- [0]	0
22	30238-03	Plak	26-50/+ [10]	0/- [0]	0
23	1009-04	Nodül	76-100/++ [40]	0/- [0]	<1
24	15413-04	Nodül	26-50/++ [20]	0/- [0]	<1
25	22493-04	Plak	26-50/++ [20]	0/- [0]	<1
26	25799-04	Nodül	51-75/++ [30]	1-5/+ [1]	<1
27	31732-04	Nodül	51-75/+ [15]	0/- [0]	<1
28	8058-05	Nodül	76-100/++ [40]	0/- [0]	<1
29	8471-05	Nodül	51-75/++ [30]	6-25/+ [5]	0
30	9032-05	Nodül	51-75/++ [30]	0/- [0]	<1
31	12339-05	Nodül	76-100/++ [40]	1-5/+ [1]	<1
32	12432-05	Plak	51-75/++ [30]	0/- [0]	0
33	16224-05	Nodül	76-100/+++ [60]	6-25/+ [5]	<1
34	19473-05	Nodül	26-50/++ [20]	1-5/+ [1]	0
35	19791-05	Nodül	26-50/+ [10]	0/- [0]	0
36	23020-05	Patch	1-5/+ [1]	0/- [0]	0
	23020-05	Nodül	1-5/+ [1]	0/- [0]	0
37	23228-05	Nodül	76-100/+++ [60]	0/- [0]	<1
38	23811-05	Nodül	51-75/++ [30]	6-25/+ [5]	<1
39	30988-05	Plak	1-5/+ [1]	0/- [0]	0
40	31668-05	Nodül	6-25/+++ [15]	26-50/+ [10]	<1
41	32327-05	Plak	1-5/+ [1]	0/- [0]	0
42	36603-05	Nodül	51-75/++ [30]	6-25/+ [5]	<1
43	6353-06	Nodül	51-75/+++ [45]	0/- [0]	<1
44	6449-06	Patch	76-100/+++ [60]	0/- [0]	<1
45	9384-06	Nodül	6-25/++ [10]	26-50/+ [10]	1

*(EK+NB)

Tablo 8: Kontrol Grubunda İmmünreaktivite Skorları ve İn-situ Hibridizasyon Sonuçları*

Tanı		Protokol No	HHV8 %/şiddet [puan]	VEGFR-3 %/şiddet [puan]	İSH HHV8 (%)
Malign hemanjiyoendotelyom	1	15734-04	0/- [0]	6-25/+ [5]	0
Kaposiform hemanjiyoendotelyom	2	25543-01	0/- [0]	76-100/+ [20]	0
	3	2248-03	0/- [0]	51-75/+ [15]	0
	4	11039-04	0/- [0]	76-100/+ [20]	0
Anjiyosarkom	5	25369-03	0/- [0]	0/- [0]	0
	6	11989-04	0/- [0]	0/- [0]	0
Eozinofilili anjiyolenfoid hiperplazi	7	28898-01	0/- [0]	0/- [0]	0
	8	22744-02	0/- [0]	0/- [0]	0
	9	25544-03	0/- [0]	51-75/+ [15]	0
	10	6198-04	0/- [0]	0/- [0]	0
	11	18264-04	0/- [0]	6-25/+ [5]	0
Masson hemanjiyomu	12	4555-03	0/- [0]	6-25/+ [5]	<1
	13	15000-03	0/- [0]	6-25/+ [5]	0
	14	21580-03	0/- [0]	1-5/+ [1]	0
	15	28535-03	0/- [0]	6-25/+ [5]	0
	16	14109-04	0/- [0]	0/- [0]	0
Staz dermatit	17	32305-03	0/- [0]	0/- [0]	0
	18	28755-05	0/- [0]	0/- [0]	0
Lenfanjiyom	19	21320-01	0/- [0]	0/- [0]	0
	20	22957-01	0/- [0]	0/- [0]	0
	21	26984-01	0/- [0]	1-5/+ [1]	0
	22	10309-02	0/- [0]	1-5/+ [1]	0
	23	415-04	0/- [0]	1-5/+ [1]	0
	24	3283-05	0/- [0]	26-50/+ [10]	0
Piyojenik granülom	25	6674-04	0/- [0]	6-25/+ [5]	0
	26	27799-04	0/- [0]	6-25/+ [5]	0
	27	30339-04	0/- [0]	26-50/+ [10]	0
	28	823-05	0/- [0]	1-5/+ [1]	0
Kavernöz hemanjiyom	29	29003-01	0/- [0]	1-5/+ [1]	0
	30	20123-03	0/- [0]	0/- [0]	0
	31	33620-03	0/- [0]	6-25/+ [5]	0
	32	23574-04	0/- [0]	6-25/+ [5]	0
	33	29195-04	0/- [0]	0/- [0]	0
	34	1162-05	0/- [0]	0/- [0]	0
Vasküler malformasyon	35	22828-01	0/- [0]	0/- [0]	0
	36	27456-04	0/- [0]	6-25/+ [5]	0
İnfanıl hemanjiyom	37	6896-04	0/- [0]	1-5/+ [1]	0
	38	12526-04	0/- [0]	6-25/+ [5]	0
	39	2478-06	0/- [0]	26-50/+ [10]	0
İğsi hücreli hemanjiyom	40	4175-06	0/- [0]	6-25/+ [5]	0
	41	7905-93	0/- [0]	0/- [0]	0
Mikrovenüler hemanjiyom	42	16975-06	0/- [0]	0/- [0]	0
Nörofibrom	43	29315-03	0/- [0]	0/- [0]	0
Post-operatif değişiklikler	44	27821-05	0/- [0]	1-5/+ [1]	0
Post-inflamatuar nedbe dokusu	45	9856-05	0/- [0]	6-25/+ [5]	0

*(EK+NB)

TARTIŞMA

Kaposi sarkomu farklı klinikoepidemiolojik tipleri olan anjiyoproliferatif bir hastalıktır (87). Kaposi sarkomu, klinik belirtileri, seyri ve patogenezi ile farklı bir neoplazidir. Erkek cinsiyet predominansı, multifokal lezyonların olabilmesi, dünyada belirli bölgelerde görülmesi ve HIV enfeksiyonu ile ilişkisi dikkat çekici özellikleridir (122). Klinik seyir, lezyonların spontan remisyonundan subkutan doku, lenf nodu, mukozal yüzeyler ve iç organlara agresif yayılıma kadar değişebilen geniş bir yelpaze oluşturur (1, 27).

Kaposi sarkomunun aşırı bir hiperplazi mi yoksa malign bir neoplazi mi olduğu konusunda hala tartışmalar vardır (22, 63). Kaposi sarkomu eskiden neoplastik bir hastalık olarak kabul edilmekteydi. Kaposi sarkomu lezyonlarının eş zamanlı olarak farklı vücut bölgelerinde simetrik tarzda oluşması, lezyonların spontan biçimde veya post-transplantasyon Kaposi sarkomunda olduğu gibi bağışıklık durumunun düzeltilmesi, HIV enfekte hastalarda ise HAART tedavisi ile regrese olduğunun gözlenmesi nedeniyle, gerçek bir tümöral proliferasyon olup olmadığı konusunda kuşklar oluşmuştur (22, 63, 87).

Kaposi sarkomunun klinik ve epidemiyolojik tiplerinde seyrin farklı olmasına rağmen, tüm tiplerde histopatolojik özelliklerin aynı olması ve hastalığın seyrinin bağışıklık durumu ile yakın ilişkisinin gözlenmesi, etyopatogenezi de enfeksiyöz bir ajanın rol oynadığı kuşkusuna neden olmuştur (63, 87, 123). İyatrojenik immünsüpresyon ile birlikte görülen ve AIDS-asosiye tiplerin bildirilmesi de bu varsayımı desteklemiştir (122).

Bu varsayım sonucu bir grup araştırmacı tarafından AIDS'li bir hastanın Kaposi sarkomu lezyonu içeren ve içermeyen normal dokusunun PCR ile karşılaştırmalı analizinde gamma herpesvirüs ailesinden viral sekanslar ile homolog DNA sekansları tanımlanmıştır (25).

İlk olarak KSHV, daha sonra HHV8 olarak tanımlanan, önceden bilinmeyen bir DNA virüsünün bulunması, bu virüsün Kaposi sarkomunun tüm klinik formları ile ilişkili olması (25, 124, 125, 126, 127) ve seroepidemiolojik veriler, KSHV/HHV8'in Kaposi sarkomu patogenezi de varsayılan enfeksiyöz ajan olduğunu ortaya koyan ilk bulgular olmuştur (128).

Kaposi sarkomu hastalarının yaklaşık %95'inin KSHV/HHV8 seropozitif olduğu gösterilmiştir (129). Kaposi sarkomunun yaygın görüldüğü popülasyonda rölatif yüksek KSHV/HHV8 seropozitivitesi saptanmıştır. Klinik olarak Kaposi sarkomu hastalığı olmayan ancak Kaposi sarkomu gelişme riski yüksek olan HIV pozitif homoseksüel erkeklerde, Afrika'da ve Güney İtalya'da KSHV/HHV8 seropozitivite oranları yüksek olup, sırasıyla

%30-40, %50-60, %15-30'dur (130, 131, 132). Kaposi sarkomu gelişme riski düşük olan Amerikalı HIV pozitif kadın ve çocuklarda ise düşük seroprevalans oranları bildirilmiştir.

İn-situ hibridizasyon, PCR ve immünohistokimya yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalarda (34, 61, 103, 107, 116, 119, 120, 128, 133) Kaposi sarkomu lezyonlarında atipik endotelial hücrelerde ve iğsi hücrelerde viral gen ekspresyonunun gösterilmesi, Kaposi sarkomu etyopatogenezinde KSHV/HHV8'in önemli bir etken olduğuna işaret etmektedir.

Bu çalışmada standart H.-E. inceleme ile Kaposi sarkomu ve Kaposi sarkomu ile ayırıcı tanıya girebilecek vasküler lezyonlarda immünohistokimyasal yöntem ve in-situ hibridizasyon ile HHV8 varlığının araştırılması, bunun kuşkulu durumlarda Kaposi sarkomu tanısı için standart histopatolojiye yardımcı bir bulgu olup olmayacağı ve bu yöntemlerden hangisinin rutin çalışmaya daha uygun olduğunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca lenfatik endotele özgü VEGFR-3 ekspresyonu incelenerek Kaposi sarkomu hücre kökeni hakkında çıkarımda bulunulmaya çalışılmıştır.

Çalışmamızda Kaposi sarkomu olguları arasında 31 (%69) klasik tip, 12 (%26,6) transplantasyon veya iyatrojenik immünsüpresyon ile birlikte görülen tip, 2 (%4,4) AIDS- asosiyel tip olgu bulunmaktaydı. Olguların 28'i (%62,2) erkek, 17'si (%37,8) kadın olup, yaş dağılımı erkeklerde 21-97, kadınlarda 3-78 yaş arasında değişmekteydi. Kadın ve erkeklerde yaş ortalamaları arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı. Çalışma grubumuzdaki Kaposi sarkomu olgularında kadın oranının rölatif olarak yüksek olduğu gözlemlendi. Bu bulgu, transplantlı ve immünsüpresif tedavi alan olgularımızın 8/12'sinin kadın olması ile açıklanabilir.

Klasik Kaposi sarkomunda bildirilen erkek:kadın oranı genellikle 10-15:1'dir (1, 27, 37, 39). Bununla birlikte bazı çalışmalarda İtalya'da 3,9:1, Yunanistan'da 1,6:1 gibi daha düşük erkek:kadın oranları da bildirilmiştir (4). Olgularımız içinde klasik Kaposi sarkomunda 2,4:1 olan erkek:kadın oranı, Brenner ve ark.'nın (134) İsrail'de 1960-1995 yılları arasında tedavi edilen klasik Kaposi sarkomlu 248 olguda 2,3:1 olarak saptadıkları erkek:kadın oranı ile paralellik göstermektedir. Böylece çalışmamızda klasik Kaposi sarkomu için saptanan erkek:kadın oranının, birçok Akdeniz havzası ülkesinden bildirilen oranlara çok yakın olduğu söylenebilir.

Klasik Kaposi sarkomu çocuklarda son derece nadir görülür (38). Çocuklarda görülen endemik Kaposi sarkomunun lenfadenopatik tipinin sıklıkla ölümle sonuçlandığı bildirilmektedir (37). Çalışmamızdaki Kaposi sarkomu olguları arasında yaygın lenfadenopati ve pansitopeni ile seyreden üç yaşındaki olgu bu açıdan dikkat çekicidir. HIV pozitifliği veya başka bir immünsüpresyon nedeni saptanmayan fatal seyirli bu olgu, yaşadığı bölgenin bir

Akdeniz ülkesi olması nedeniyle klinik olarak akselere seyirli bir klasik Kaposi sarkomu olgusu olarak kabul edilmiştir. Çalışmamızdaki gruplandırma da bu veri ışığında yapılmıştır.

Klasik Kaposi sarkomu tipik olarak alt ekstremiteler distalinde görülür (16, 37, 38, 42, 55, 75). Çalışma grubumuzdaki olguların 21/31'inde (%67,8) de lezyonlar alt ekstremitelere yerleşmişti. Diğerleri ise 4 olgu (%13) ile baş-boyun, 2'şer olgu (%6,4) ile üst ekstremitelere, gövde ve penis gibi bölgelere dağılmaktaydı. HIV pozitifliğinin eşlik ettiği iki erkek hastada lezyonlar üst ekstremitelere yerleşmişti.

Çalışmamızda transplantasyon veya iyatrojenik immünsüpresyon ile birlikte görülen Kaposi sarkomunun %26,6 (12/45) gibi göreceli yüksek bir oranda olması, İ. Ü. İstanbul Tıp Fakültesi'nin referans hastanesi olmasıyla açıklanabilir. Çalışmamızda bu grupta yer alan Kaposi sarkomu olgularında erkek:kadın oranı 1:2 idi. Literatürde ise bu grup için 2,3:1 gibi bir oran bildirilmektedir (39). Çalışmamızda saptanan erkek:kadın oranı ile literatürde bildirilen oran arasındaki bu farklılık, çalışmamızdaki olgu sayısının göreceli az olması ile ilişkili olabilir.

Kaposi sarkomunun transplant hastalarında görülme yaşı, transplantasyon veya immünsüpresif tedavinin süresi ile ilişkili olup, lezyonların ortaya çıkışı genellikle 40'lı yaşlardadır (135). Erkek:kadın oranı 3,3 ile 1 arasında değişmektedir (136). Çalışmamızda transplantasyon yapılmış Kaposi sarkomu olgularının yaşları 34-46 arasında değişmekte olup, hastaların ikisi kadın, ikisi ise erkektir.

Transplantasyon veya iyatrojenik immünsüpresyon ile birlikte görülen Kaposi sarkomu olgularının %90'ında lezyonlar mukokütanöz yerleşimlidir (46). Deri lezyonları bacaklar başta olmak üzere, gövde ve kollarda görülür (135). Çalışmamızdaki transplant olgularında da lezyonlar bir hastada gingiva, diğer 3 hastada ise alt ekstremitelere yerleşimli deri lezyonları şeklindeydi. İmmünsüpresyon alan diğer 8 olguda ise lezyonlar 4 hastada alt ekstremitelere, 1 hastada dil ve üst ekstremitelere, 1 hastada göğüs ve alt ekstremitelere, 1'er hastada üst ekstremitelere ve lenf gangliyonu yerleşmişti.

Transplantasyonlu olgularımızda Kaposi sarkomu gelişmesi için geçen süre, böbrek transplantasyonlu 2 hastada 4 ve 11 yıl, HBV'ye bağlı karaciğer transplantasyonu yapılan hastada ise 9 ay olmuştur. Transplantasyon sonrası Kaposi sarkomunun ortalama 20 ay (2 ay-18 yıl) içinde görüldüğü (46, 135), bu sürenin karaciğer transplantasyonu sonrası daha kısa olduğu bildirilmektedir (46). Karaciğer transplantasyonu sonrasında sürenin daha kısa olması, bu hastalarda HBV'nin yüksek prevalansına bağlanmıştır (46, 135).

İ. Ü. İstanbul Tıp Fakültesi serisinde Ekim 1983-Aralık 1997 yılları arasında 557 böbrek transplantlı hastanın 25'inde malignite geliştiği ve bunların 17'sinin (%68) Kaposi

sarkomu olduğu bildirilmiştir. Transplant hastalarının %3'ünde gelişen Kaposi sarkomu için ortalama süre 15,9 (1-65 ay) ay olup, hastaların 14'ü erkek, üçü kadındır (137).

Huang ve ark. (138), Tayvan'da böbrek transplantasyonlu hastalarda Kaposi sarkomu insidensini %0,7 olarak saptamışlardır. Göreceli düşük olan bu oran, ırksal ve coğrafik faktörlerin posttransplant Kaposi sarkomu patogenezinde önemli olduğunu göstermektedir. Aynı araştırmacılar olguların birinde siklosporinin mikofenolat mofetil ile değiştirilmesiyle tümör regresyonu, diğer bir olguda ise siklosporin tedavisinin kesilmesi ile remisyon gözlenmesi nedeniyle, siklosporinin patogeneizde önemli rol oynadığını ileri sürmüşlerdir (138).

KSHV/HHV8 seroprevalansının yüksek olduğu orta ve güney İtalya'da böbrek transplantasyonu bekleyen hastalar ile kontrol grubunda KSHV/HHV8 seroprevalans oranları sırasıyla %14,8 ve %14,9 olarak bildirilmektedir (139). Transplantasyon öncesi seropozitif hastaların %23'ünde, seronegatif hastaların %0,7'sinde Kaposi sarkomu gelişmesi nedeniyle, transplantasyon öncesi seropozitif hastalarda riskin belirgin olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bulgular ışığında transplantasyon bekleyen hastalarda KSHV/HHV8 varlığı araştırılmasının Kaposi sarkomu için yüksek risk altında olan kişilerin belirlenmesinde yararlı olacağı ileri sürülmüştür (139).

Çalışmamızda anti-HHV8 antikoru (klon 13B10) kullanılarak yapılan incelemede Kaposi sarkomu olgularının tümünde (%100) çekirdek reaktivitesi biçiminde immünreaktivite saptandı. Nodül evresi lezyonlarda içsi hücrelerde, patch ve plak döneminde yarıklar tarzındaki patolojik damarları döşeyen endotelial hücrelerde immünreaktivite izlendi.

Cheuk ve ark. (5), Kaposi sarkomu tanısında HHV8 LNA-1 antikorunun (klon 13B10) kullanılabilirliğini araştırdıkları çalışmada tüm Kaposi sarkomu lezyonlarında çekirdekte granüler paternde diffüz boyanma saptamışlar, ayrıca patch ve plak evresinden nodüler evreye doğru pozitif boyanan hücre oranı ve boyanma yoğunluğunun arttığını gözlemişlerdir. Bu çalışmada da, bulgularımızla paralel biçimde, Kaposi sarkomu ile ayırıcı tanıya girebilecek vasküler lezyonlarda immünreaktivite saptanmadığı bildirilmektedir. Cheuk ve ark., immünreaktivitenin yüksek oranlarda duyarlı ve özgül olması nedeniyle, Kaposi sarkomu düşündüren 5 lezyondan HHV8 LNA-1 pozitifliği belirledikleri 4 olguda bu bulguyu erken evre Kaposi sarkomu lehine bir kanıt olarak kabul etmişlerdir (5).

Cheuk ve ark.'nın (5) çalışmasında incelenen 7 patch, 11 plak, 32 nodül evresinden oluşan Kaposi sarkomu olgularına benzer biçimde, çalışmamızda incelenen olgular 4 patch, 13 plak ve 32 nodül evresinden oluşmaktaydı. Bu yazarlar pozitif reaksiyon gösteren hücre yüzdesi ve şiddetinin patch ve plak lezyondan nodüler lezyona doğru arttığını gözlemişlerdir.

Patch, plak ve nodül evrelerinde boyanan hücre yüzdesi ve boyanma yoğunluğu ile saptadıkları ortalama skor sırasıyla 2,9, 2,7 ve 4,9 olarak verilmektedir. Olgularımızda ise ortalama skor patch, plak ve nodül evresi için sırasıyla 5,3, 3,7 ve 5,1'dir. Bu farklılığın nedeni, çalışmamızda patch evresindeki 4 olgunun üçünde HHV8 pozitif hücre sayısı ve şiddetinin yüksek olması ve bu gruptaki olgu sayısının az olması ile açıklanabilir. Başka çalışmalarda da boyanan hücre yüzdesinin patch ve plak lezyondan nodüler lezyona doğru arttığı bildirilmiştir (6, 10, 140).

Robin ve ark. (7), 72 Kaposi sarkomu ve Kaposi sarkomu ayırıcı tanısına girebilecek 108 vasküler lezyonda HHV8 LNA-1 varlığını araştırdıkları çalışmada teknik problemler sonucu pozitif reaksiyon saptamadıklarını düşündükleri 1 olgu dışında tüm Kaposi sarkomu olgularının %75'inde diffüz, %25'inde fokal olarak iğsi hücreler ile endotelyal hücrelerde pozitif immünreaksiyon saptarken, iğsi hücre komponenti olan 34 anjiyosarkom içeren diğer vasküler lezyonların hiçbirinde immünreaksiyon izlememişlerdir. Bu çalışmada HHV-8 LNA-1 pozitifliğinin Kaposi sarkomu için duyarlılık oranı %99, özgüllük oranı ise %100 olarak bildirilmiştir. Bu serideki Kaposi sarkomu olguları 45 klasik tip, 8 endemik tip, 16 AIDS-asosiyasyonlu tip, 3 transplantasyon veya iyatrojenik immünyüpresyon ile birlikte görülen tipten oluşmaktadır. Bu çalışmada da saptamış olduğumuz bulgular ile paralel biçimde epidemiyolojik tipler arasında immünreaksiyon açısından anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Robin ve ark.'nın çalışmasında Kaposi sarkomu tanısı HHV8 DNA sekanslarının saptanmasıyla değil, klinik, histolojik ve immünhistokimyasal verilere dayanılarak konmuştur. İntraselüler DNA sekans varlığının tanıda kullanılmamış olmasının diğer araştırmacılar tarafından çalışmanın eksik yönü olarak değerlendirilebileceği belirtilmektedir. Ancak, RT-PCR yöntemi duyarlı olmakla birlikte, karmaşık bir yöntem olduğu, dolanan infekte hücrelere veya kontaminasyona bağlı olarak yanlış pozitifliğe ya da hatalı yoruma neden olabileceği, bu nedenle RT-PCR'in her zaman mikroskopik ve immünhistokimyasal inceleme ile birlikte değerlendirilmesi gerektiği yazarlar tarafından vurgulanmaktadır (7).

Patel ve ark. (6), Kaposi sarkomu ve 5 deri anjiyosarkomu içeren ayırıcı tanıya girebilecek vasküler lezyonlarda HHV8 LNA-1 (klon LN53) ile yaptıkları çalışmada tüm Kaposi sarkomu olgularında pozitif, tüm vasküler lezyonlarda ise negatif sonuç elde etmişlerdir. Bu yazarlar da patch ve plak dönemi lezyonlarda nodüler lezyonlara göre daha az sayıda hücrede pozitiflik bildirmektedir. Bu çalışmada yüksek duyarlılık ve özgüllük oranları nedeniyle immünhistokimyasal olarak HHV8 LNA-1 saptanmasının Kaposi sarkomu ayırıcı tanısında yararlı olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak Pantanowitz ve ark. (141), bu çalışmanın gerçekleştirildiği ABD'de KSHV/HHV8 infeksiyon prevalansının düşük olduğunu, Kaposi

sarkomu dışı vasküler lezyonlu hastaların KSHV/HHV8 infeksiyon durumlarının belirtilmediğine işaret etmişler ve bu nedenle Kaposi sarkomu tanısının sadece lezyonlu dokularda KSHV/HHV8 varlığına dayandırılmaması gerektiğini ileri sürmüşlerdir.

1960'lı yılların başına ait endemik Kaposi sarkomu, yeni tanı alan AIDS-asosiyeye Kaposi sarkomu, sonradan Kaposi sarkomu tanısı almış 1 atipik vasküler lezyon ile benign vasküler lezyonlar ve anjiyosarkomda HHV8 LNA-1 (klon 13B10) ekspresyonunun araştırıldığı Schwartz ve ark.'nın (8) çalışmasında endemik Kaposi sarkomlu 16 olgudan 5'i dışında tüm Kaposi sarkomu olgularında pozitif, diğer vasküler lezyonlarda negatif sonuç elde edilmiştir. Lezyonları oluşturan hücrelerde %5-70 arasında değişen oranlarda beneklenme şeklinde çekirdek boyanması saptanmıştır. Endemik Kaposi sarkomu olgularının negatif olması ise, örneklerin eski yıllara ait olması nedeniyle zayıf antijeniteye bağlanmıştır.

Bir başka çalışmada ise Hong ve ark. (9), HHV8 LNA-1 (klon 13B10) ile 29/37 (%78) Kaposi sarkomu olgusunda belirlenen pozitif immünreaksiyon ile HIV seropozitifliği, yaş, cinsiyet, tümör nüksü, sayısı ve lokalizasyonu gibi klinik özellikler arasında anlamlı istatistiksel ilişki saptamamışlardır. Çalışmamızda tüm Kaposi sarkomu olgularında HHV8 LNA-1 ile pozitif immünreaksiyon saptandığından, klinik özellikler ile HHV8 varlığı arasında karşılaştırma yapılmamıştır.

Hong ve ark.'nın (9) çalışmasında, Cheuk ve ark.'nın (5) tüm Kaposi sarkomu lezyonlarında (%100) pozitif reaksiyon saptadıkları çalışmada kullanılan aynı antikor ile daha düşük oranda (%78) pozitif sonuç elde edilmiş olması dikkat çekicidir. Bu farklılığın, antijen retrieval işleminde daha efektif olan EDTA kullanılmasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür (5). Çalışmamızda Hong ve ark.'nın çalışmasında olduğu gibi antijen retrieval işleminde sitrat tamponu kullanılmış olmasına rağmen, tüm Kaposi sarkomu lezyonlarında pozitif sonuç elde edilmiştir.

Parravicini ve ark. (107) KSHV/HHV8 ilişkili Kaposi sarkomu, primer efüzyon lenfoması ve multisentrik Castleman hastalığında latent ve litik gen proteinleri olan LNA (ORF 73), vIL6 (ORF K2), vIRF1 (ORF K9), PF-8 (ORF 59, processivity factor-8) ekspresyonunu araştırmışlardır. Bu çalışmada Kaposi sarkomu lezyonlarında iğsi ve endotelial hücrelerde sadece LNA, bu hücrelerin küçük bir kısmında aynı zamanda PF-8 eksprese edildiği belirtilmektedir. Primer efüzyon lenfomasında LNA ve vIL6 pozitifliği, multisentrik Castleman hastalığında ise tüm proteinler ile pozitif sonuç saptanmıştır.

Dupin ve ark. da PCR ile HHV8 negatif olan multipl miyelomlu kemik iliği biyopsilerinde, HIV negatif multisentrik Castleman hastalığında, hemanjiyom ve prostat karsinomunda HHV8 LNA-1 ile reaksiyon saptamamışlardır (10). Çalışmamızda Kaposi

sarkomu olgularında HHV8 LNA-1 ile epidermis, ekrim ter bezi, normal endotel hücreleri, lenfositler ve plazma hücreleri gibi lezyon dışı yapılarda diğer çalışmalara (5, 8, 9, 11, 107, 142) paralel biçimde pozitif reaksiyon gözlenmedi.

Dupin ve ark. (10), PCR ile HHV8 pozitif Kaposi sarkomu, primer efüzyon lenfoması ve multisentrik Castleman hastalığında HHV8 ORF 73 ekspresyonunu araştırdıkları çalışmada HHV8 LNA-1 (klon LN53) ile patch, plak ve nodül evresi lezyonlarda ektazik damar duvarlarını oluşturan ve bu damarlar arasındaki içi hücrelerde sırasıyla $\leq 10\%$,

Bazı çalışmalarda PCR ile HHV8 viral DNA'sının anjiyosarkomda saptandığı (143, 144, 145), bazı çalışmalarda ise saptanmadığı (146, 147) bildirilmiştir. HHV8 varlığının immünohistokimyasal yöntem kullanılarak araştırıldığı birçok çalışma (5, 6, 7, 8, 148) ile benzer biçimde, anjiyosarkom olgularımızda da in-situ hibridizasyon ve immünohistokimyasal yöntemlerin her ikisiyle de HHV8 pozitifliği saptanmadı.

HHV8 viral DNA'sı varlığı ilk olarak 1996 yılında HIV durumu bilinmeyen anjiyosarkomlu bir Japon hasta (149) ile yine aynı yıl idiyopatik anjiyosarkomlu bir Macar hastada (150) bildirilmiştir. McDonagh ve ark. (143) immün yetmezliği olduğu bilinen bir olgu dışında klinik bilgisi olmayan 7/24 anjiyosarkomlu hastada, Remick ve ark. (145) ise HIV negatif diseminan anjiyosarkomlu bir hasta ile birlikte 3/8 başka anjiyosarkomlu hastada HHV8 DNA sekansları saptamışlardır.

Anjiyosarkomda HHV8 DNA sekans varlığı bildirilen ilk çalışmalar Macaristan ve İtalya gibi KSHV/HHV8 seroprevalansının orta-yüksek olduğu bölgelerdir. Bu çalışmalarda HHV8 DNA varlığının tesadüfi bir bulgu olup olmadığı veya virüsün doğrudan anjiyosarkom hücrelerinde mi bulunduğu açıklanamamıştır (148). Bununla birlikte, bir çok araştırmacı PCR sonuçlarını in-situ hibridizasyon ve diğer yöntemlerle destekleyerek doğrulamışlardır. Bu nedenle yalnızca birkaç çalışmada anjiyosarkomda HHV8 DNA varlığının yanlış pozitif sonuç olabileceği ileri sürülmüştür (148). Anjiyosarkomda HHV8 varlığı hakkındaki veriler çelişkili olup, bu malign tümörün anatomik ve histopatolojik özellikleri ya da hastaların immünojenik durumu, gözlenen farklılıkları açıklamak için yeterli olmamıştır.

KSHV/HHV8'in endotel hücre tropizmi göstermesi Kaposi sarkomu dışında anjiyosarkom, hemanjiyom ve eozinofilili anjiyolenfoid hiperplazi gibi vasküler lezyonlar ile KSHV/HHV8'in olası ilişkisini akla getirmiştir (148). KSHV/HHV8 seroprevalansının düşük olduğu Almanya'da KSHV/HHV8'in anjiyosarkom patogeneğinde olası rolünü göstermek

amacıyla Schmid ve ark. (148), HIV pozitif Kaposi sarkomu ve multisentrik Castleman hastalığı ile HIV negatif anjiyosarkom ve hemanjiyomlu hastalarda immünohistokimyasal yöntemle HHV8 LNA-1 ve PCR ile HHV8 VP23 DNA sekans varlığını araştırmışlardır. Her iki yöntemle Kaposi sarkomu ve multisentrik Castleman hastalığında pozitif, anjiyosarkom ve hemanjiyomda negatif sonuç saptanması nedeniyle KSHV/HHV8'in anjiyosarkom patogenezinde rolü olmadığı bildirilmiştir.

Cheuk ve ark. da, bazı PCR çalışmalarından farklı olarak immünohistokimyasal inceleme ile anjiyosarkomda HHV8 LNA-1 saptamamışlar ve immünohistokimyasal yöntemle lezyonu oluşturan hücrelerde immünreaktivite belirlenmesinin daha güvenilir olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmacılara göre PCR'a dayalı çalışmalarda yanlış pozitif sonuçlar HHV8 pozitif lenfositlerle kontaminasyon, nonspesifik amplifikasyon veya Kaposi sarkomunun anjiyosarkom şeklinde yanlış tanı almasına bağlı olabilir (5).

Kaposi sarkomunda negatif olan düz kas aktini ve faktör VIII'in Kaposi sarkomu ayırıcı tanısına giren Kaposi sarkomuna benzeyen piyojenik granülom lezyonlarında CD31 ve CD34 ile birlikte pozitif olduğu bildirilmiştir (151). Bir başka çalışmada ise Kaposi sarkomuna benzeyen piyojenik granülom profili ile uyumlu biçimde düz kas aktini, faktör VIII, CD31 ve CD34'ün birlikte pozitif olduğu iki hastada PCR ile KSHV/HHV8 varlığı gösterilmesi nedeniyle, tanının sadece immünohistokimyasal bulgulara dayanmaması gerektiği belirtilmektedir (152). Benzer şekilde bir başka çalışmada, immünohistokimyasal olarak HHV8 LNA-1 ile piyojenik granülom benzeri Kaposi sarkomunda (6/6) pozitif immünreaktivite elde edilirken, piyojenik granülomda (0/28) immünreaktivite saptanmaması da HHV8 varlığının spesifik bir belirleyici olduğunu göstermektedir (153).

Diğer çalışmalara (5, 6, 7, 11, 142) benzer biçimde çalışmamızda da Kaposi sarkomu ayırıcı tanısına giren vasküler lezyonlarda HHV8 LNA-1 için immünreaksiyon saptanmamıştır. Böylece HHV8 LNA-1 reaktivitesinin Kaposi sarkomu için duyarlılık ve özgüllük oranları %100 düzeyine ulaşmaktadır. Bu bulgular alışılmadık klinik özellik, lokalizasyon ve histolojili Kaposi sarkomu olgularında tanının doğrulanması amacıyla HHV8 LNA-1 immünohistokimyasal incelemesinin özgül ve duyarlı bir yöntem olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca PCR'a dayanan yöntemlere göre uygulanması oldukça kolay olup, uzun zaman harcanması, yoğun iş gücü ve teknik bilgisi çok ileri olan laboratuvar personeli gerektirmemektedir.

Çalışmamızın bir diğer amacı ise KSHV/HHV8 varlığının in-situ hibridizasyon yöntemi ile araştırılması ve bu yöntemin immünohistokimyasal yöntem ile uygulama kolaylığı ve sonuçlar açısından karşılaştırılması olmuştur.

İn-situ hibridizasyon yöntemi, immünohistokimya ile birlikte veya PCR ile birleştirilerek (in-situ PCR) uygulanabilir (115). İn-situ hibridizasyonda RNA, DNA ve sentetik oligonükleotid problemler kullanılmaktadır. Bu problemlere radyoaktif veya peroksidaz, biyotin, digoksinin gibi radyoaktif olmayan işaretleyicilerin eklenmesi ile reaksiyon görünür hale getirilir.

Çalışmamızda T1.1 mRNA olarak nitelendirilen transkript karşı hazırlanmış, fluorescein ile konjuge edilmiş oligonükleotid prob kokteyli kullanılarak gerçekleştirilen in-situ hibridizasyon yöntemiyle immünohistokimyasal yöntemle göre daha az sayıda Kaposi sarkomu olgusunda ve çok az sayıda hücrede pozitif reaksiyon saptandı. Kaposi sarkomu olgularının sadece 29'unda (%64,4) ve en yoğun reaktivite gözlenen olguda bile hücrelerin sadece %1'inde çekirdek reaktivitesi biçiminde pozitifite belirlendi. Diğer tüm pozitif olgularda bu oran %1'in altındaydı.

Kaposi sarkomu iğsi ve endotelial hücrelerde latent olarak eksprese edilen ORF K12 (T0.7/Kaposin) RNA in-situ inceleme için uygun bir hedefdir. KSHV/HHV8 litik infeksiyon ile ilişkili ORF K7 (T1.1/nut-1), az sayıda hücrede de olsa fazla eksprese edildiğinden, diğer hedef transkript olarak kabul edilebilir (56, 118).

KSHV/HHV8 ile latent infeksiyon fazındaki hücrelerde eksprese edilen T0.7 mRNA küçük bir membran proteini kodlar. Sturzl ve ark. (61), olası latent faz KSHV/HHV8 infeksiyonunu göstermek için T0.7 mRNA için hazırlanmış radyoaktif S35 işaretli RNA probu ile farklı epidemiyolojik kökenli Kaposi sarkomu lezyonlarında in-situ hibridizasyon çalışması gerçekleştirmişler ve epidemiyolojik tipten bağımsız olarak tüm Kaposi sarkomu lezyonlarında pozitiflik saptamışlardır. Geç dönem nodüler lezyonda (%50-70) erken patch lezyona göre (%1-3) belirgin olarak daha yüksek sayıda T0.7 eksprese eden hücre belirlemişlerdir. Sturzl ve ark.'nın çalışmasındaki bu sonuçlar Kaposi sarkomunun tüm tiplerinde latent KSHV/HHV8 infeksiyonun baskın olduğunu gösterir niteliktedir. Aynı araştırmacılar epidermis, dermal fibroblastik hücreler, kan damarı ile ilişkili hücreler gibi Kaposi sarkomu lezyonlarının çevresindeki dokuların yanısıra, AIDS-asosiyeye Kaposi sarkomlu bir olgunun lezyon içermeyen bir deri bölgesinde de T0.7 ekspresyonu saptamamışlardır.

Staskus ve ark. (34), Kaposi sarkomu, anjiyomatöz lezyonlar (hemanjiyom, hemanjiyosarkom, granülasyon dokusu vb.) ve çeşitli organ tümörlerinde (prostat ve kolon adenokarsinomu, gliyoblastom, seboreik keratoz vb.) anti-CD34 immünohistokimyasal yöntemle kombine biçimde in-situ hibridizasyon ile T0.7 ve T1.1 ekspresyonunu araştırmışlardır. T0.7 ile erken patch lezyon dahil tüm lezyonlarda, T1.1 ile erken patch

lezyon dışındaki diğer lezyonlarda pozitif reaksiyon elde edilmiştir. Bu çalışmada in-situ hibridizasyon radyoaktif ve radyoaktif olmayan işaretleyiciler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Radyoaktif S35 işaretli T0.7 ile nodüler lezyonda ortalama %85 hücrede, T1.1 ile %10 hücrede pozitif reaksiyon gözlenmiştir. Digoksinin işaretli T1.1 ile işi hücrelerde yüksek nükleer reaktivite saptanmıştır. Ayrıca digoksinin işaretli T1.1 ve radyoaktif S35 işaretli MCP (ORF 25, major viral capsid protein) birlikte kullanılarak viral RNA'nın kolokalizasyonu gösterilmiştir (34).

Çalışmamızda ise lenf ganglionunda nodül evresi Kaposi sarkomu yanısıra diffüz büyük B hücreli lenfoması olan 45 no'lu olguda hücrelerin sadece %1'inde, diğer tüm pozitif olgularda patch, plak, nodül evresi farketmeksizin %1'in altında reaktivite saptandı. Sonuçların, diğer çalışmalarda (34, 61) saptanan değerlerden belirgin farklılık göstermesi, in-situ hibridizasyon çalışmasında kullandığımız probun litik fazda infekte hücrelerden ekspres edilen T1.1 mRNA'ya karşı hazırlanmış olması veya hibridizasyon reaksiyonunu görünür hale getirmek için kullanılan işaretleyicinin radyoaktif S35 kadar duyarlı olmamasına bağlı olabilir. Diğer yandan Kaposi sarkomu lezyonunda litik infeksiyon fazında olan hücre sayısının latent infeksiyon fazında olanlara göre daha az olduğu bildirilmektedir (61, 116).

Staskus ve ark.'nın çalışmasında HIV infekte AIDS'li 4 hastada Kaposi sarkomu lezyonu ile birlikte başka bir vücut bölgesinden granülasyon dokusu veya hemanjiyomda T0.7 ekspresyonu eş zamanlı olarak araştırılmış ve sadece Kaposi sarkomunda pozitivite saptanmıştır (34). Olgularımızda da Kaposi sarkomu ile eş zamanlı olarak farklı bir vücut bölgesinden eksize edilen nörofibromda ve 2 Kaposi sarkomu hastasında nedbe dokusunda her iki yöntemle de immünreaktivite görülmedi.

Staskus ve ark., Kaposi sarkomu dışındaki lezyonlardan sadece HIV negatif prostat adenokarsinom olgusunda normal glandları döşeyen hücrelerde T0.7 RNA pozitivitesi saptamaları nedeniyle, cinsel temas ile bulaşmanın erkek genital sisteminden virüs veya infekte hücre ekskresyonu ile olabileceğini düşünerek, rastgele seçilmiş HIV seropozitif ve negatif olgularda prostat örnekleri incelemişlerdir. Bu olguların 12/16'sında hibridizasyon pozitif hücrelerin glandüler epitelde lokalize olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç ışığında KSHV/HHV8 ile latent infeksiyon fazındaki prostatik hücre salgılarının seksüel bulaşta önemli olabileceği ileri sürülmüştür (34).

Deride KSHV/HHV8 varlığının Kaposi sarkomu lezyonu ile sınırlı olması, Kaposi sarkomu gelişiminde KSHV/HHV8'in önemli patojenik faktör olduğunu göstermektedir. Ancak yine de, KSHV/HHV8'in Kaposi sarkomu lokal gelişimini mi tetiklediği ya da lezyona ikincil olarak katılıp, geç döneme progresyona mı neden olduğu belli değildir. Sturzl ve

ark.'nın çalışmasında erken patch lezyonda T0.7'nin sadece birkaç hücrede saptanması ikinci olasılığı daha ön plana çıkarsa da, KSHV/HHV8 ile latent infeksiyon fazındaki erken Kaposi sarkomu hücrelerinde T0.7 mRNA sentezinin ilerlemiş lezyon hücrelerinden daha az olması da mümkündür (61).

Reed ve ark.'nın (119) duyarlılığı artıran biyotin işaretli tiramin kullanılarak uyguladığı in-situ hibridizasyon çalışmasında, latent dönemde eksprese edilen v-cyclinD (ORF 72), Kaposi sarkomunun tüm tiplerinde, plak ve nodüler lezyonda daha fazla olmak üzere tüm evrelerde saptanmıştır. KSHV/HHV8 v-cyclinD gen ekspresyonu atipik vasküler boşlukları çevreleyen işsi hücreler ile komşu dermisteki bazı kan damarlarının endotel hücreleri yanısıra, birkaç geç dönem lezyonda keratinositlerde ve ekrin ter bezi epitel hücrelerinde de belirlenmiştir (119). Çalışmamızda plak dönemine ait olgulardan birinde epidermiste reaktivitenin yanısıra zemin boyanması izlenirken, diğer bir olguda ise birkaç işsi hücre ile birlikte ekrin ter bezinde de reaktivite saptandı. Birinci olguda tekrar yapıldığında birkaç işsi hücrenin yanısıra kıl folikülü ve ekrin ter bezi epitel hücrelerinde de reaktivite gözlemlendi.

İn-situ hibridizasyon yöntemi ile çalışmamızda kontrol grubu vasküler lezyonlarda bir olgu dışında reaktivite görülmedi. Masson hemanjiyomlu bu olguda ekrin ter bezi hücrelerinde ve epidermiste fokal reaktivite görülürken, lezyonu oluşturan hücrelerde reaktivite gözlenmedi. Kontrol grubu olgularından sadece 1 olguda pozitiflik saptanması nedeniyle, Kaposi sarkomu olgularında az sayıda hücrede pozitiflik saptanmasına karşın, yöntemin yüksek bir özgüllük oranı olduğu hesaplandı. İn-situ hibridizasyon yönteminde duyarlılık ve özgüllük oranları sırasıyla %64,4 ve %97,8 olarak gerçekleşti.

Kaposi sarkomunda KSHV/HHV8 RNA ekspresyonunun 3 farklı yöntemle araştırıldığı bir çalışmada, daha duyarlı olan RT-PCR ile Northern blot ve in-situ hibridizasyona göre daha yüksek oranda pozitiflik saptanmıştır. Bunun sebebinin tüm Kaposi sarkomu örneklerinde KSHV/HHV8 RNA ekspresyon düzeyinin duyarlılığı az olan yöntemler ile saptanacak kadar yüksek olmamasına bağlı olduğu ileri sürülmüştür (121).

Tümör hücrelerinde HHV8 DNA veya messenger RNA'sının PCR'a dayanan teknikler ile saptanmasının, Kaposi sarkomu için oldukça yüksek oranlarda duyarlı bir test olduğu gösterilmiş ve ayırıcı tanıda yardımcı olabileceği düşünülmüştür (154, 155, 156). Birçok çalışmada (154, 155, 157) diğer vasküler lezyonlarda KSHV/HHV8 bulunmadığının gösterilmesine karşın, anjiyosarkom (143, 144, 145), piyojenik granülom (158), hemanjiyom (143), retiform hemanjiyoendotelyom (159) ve başka bir vücut bölgesinde Kaposi sarkomu olan venöz hemanjiyom (160) olgularında HHV8 pozitifliği bildirilmiştir.

KSHV/HHV8'in Kaposi sarkomu için özgül olduğunun gösterilmesi nedeniyle, ayırıcı tanıda PCR ile KSHV/HHV8 varlığı araştırılmasının ek bir tanısal araç olabileceği ileri sürülmüştür (161). Kaposi sarkomu lezyonlarının tümünde pozitiflik saptanırken, mezenkimal deri tümörleri, inflamatuvar deri lezyonları, verrüler ve normal deride saptanmaması, PCR yönteminin tanısal değerini destekler niteliktedir (120, 154). Diğer yandan, Kaposi sarkomu hastalarının tümöral olmayan dokularında PCR ile %50'ye varan oranlarda KSHV/HHV8 DNA saptandığı bildirilmektedir (35, 126, 162, 163). Bu dokulardaki virüs yükünün lezyondaki virüs yükünden daha az olduğu ve dolanan KSHV/HHV8 infekte hücreleri yansıttığı ileri sürülmüştür. Ancak bu sonuç PCR'ın Kaposi sarkomu için diyagnostik test olma özgülüğünü azaltmaktadır.

Pak ve ark. (140) PCR ve immünohistokimya yöntemleri ile HHV8 varlığını değerlendirdikleri çalışmada erken evre patch ve plak lezyonlardan nodüler lezyona doğru PCR ile HHV8 oranı ile LNA(+)/CD34(+) iğsi hücre sayı ve yüzdesinin arttığını saptamışlardır. Bu sonuç ile Kaposi sarkomunun erken evre lezyondan nodüler lezyona doğru gelişmesinin tümör hücre sayısı ve virüs yükünün rölatif artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kaposi sarkomu iğsi hücrelerinin %10-15 oranında CD34(+)/LNA(-) olduğunu saptamaları nedeniyle, diğer çalışmalardan farklı olarak konvansiyonel histopatolojiye ek olarak PCR ile HHV8 varlığının değerlendirilmesinin basit ve duyarlı bir yöntem olduğu yazarlar tarafından belirtilmektedir.

Courville ve ark. (11), HHV8 LNA-1 ile immünohistokimyasal incelemenin yanısıra, aynı parafin kesitlerde HHV8 DNA varlığını belirlemek için in vitro PCR da uygulamışlardır. Her iki yöntem ile Kaposi sarkomu olgularının tümünde HHV8 varlığı saptanırken, Kaposi sarkomu benzeri lezyonlar ve Kaposi sarkomu olmaksızın HHV8 infekte hastalarda dokuda HHV8 varlığı belirlenmemiştir. Kaposi sarkomu tanısı şüpheli olgulardan 14/22'sinde her iki yöntem ile HHV8 varlığı gösterilmiş ve bu olgularda daha sonra Kaposi sarkomuna uygun klinik özellikler gelişmiştir.

Hammock ve ark. (164), HIV pozitif hastalarda HHV8 koinfeksiyonunu belirlemek için HHV8 LNA-1 (klon 13B10) ile immünohistokimyasal incelemenin yanısıra, kantitatif analiz sağlayan real-time PCR yöntemi ile HHV8 DNA'sını araştırdıkları çalışmada her iki yöntem ile sırasıyla Kaposi sarkomunda 22/24 (%92), 24/24 (%100), hemanjiyomda 0/12 (%0), 4/12 (%25) pozitif olgu saptamışlardır. Epiteloid hemanjiyomlu 1 olguda ise her iki yöntemle de negatif sonuç saptanmıştır. Hemanjiyomda HHV8 DNA varlığının yüksek olmasının bir çok nedene bağlı olabileceği, örneğin HIV pozitif hastaların KSHV/HHV8 ile koinfekte olup, kan

mononükleer hücrelerinin latent DNA içermesinin söz konusu olabileceği bir açıklama olarak ileri sürülmüştür.

Katano ve ark. (142) tarafından HHV8 ORF 73 latent proteine karşı elde edilen antikor (PA1-73N) kullanılarak, IFA, Western blot ve immünohistokimya yöntemleri ile Kaposi sarkomunda ekspresyonu araştırılmıştır. Tüm Kaposi sarkomu olgularında benzer nükleer boyanma izlenmiştir. Tümör dışı endotel hücreleri, fibroblast, makrofaj veya lenfositlerin yanısıra, çeşitli normal dokularda (deri, gastrointestinal sistem, karaciğer, akciğer, böbrek ve dalak) ve diğer vasküler lezyonlarda (anjiosarkom, hemanjiyom, granülasyon dokusu) ise reaksiyon saptanmamıştır. Eş zamanlı olarak araştırılan litik protein ORF 59'un, Kaposi sarkomu tümör hücrelerinin küçük bir kısmında eksprese edildiği ve ORF 59 pozitif hücrelerin PA1-73N ile reaksiyon göstermediği belirlenmiştir. ORF 73 proteininin çoğu Kaposi sarkomu iğsi hücresinde eksprese edildiğinin gösterilmesi, KSHV/HHV8 ile infekte iğsi hücrelerin büyük kısmının latent infeksiyon fazında olduğunu düşündürmektedir.

Blasig ve ark. (165), PCR ile HHV8 pozitif olan HIV infekte homoseksüel erkek AIDS hastalarına ait nodüler lezyonlarda, litik faz belirleyicisi olan VP23 (ORF 26) ekspresyonunu araştırdıkları in-situ hibridizasyon çalışmasında, radyoaktif S35 işaretli RNA probu ile HHV8 spesifik sinyali, monositik hücre dağılımını andıran birçok hücre ile iğsi hücrelerin birkaçında saptamışlardır. Bu in-situ hibridizasyon yöntemi, Kaposi sarkomu lezyonlarında litik infeksiyon fazındaki hücreleri belirleyebilmek amacıyla anti-LCA (leukocyte common antigen) ve MAC387 (monocyte/macrophage associated antigen) antikorlarının kullanıldığı immünohistokimya yöntemiyle birleştirilmiş ve in-situ hibridizasyon ile belirlenen HHV8 infekte litik hücrelerin bir kısmının monosit kökenli olduğu belirlenmiştir. Bu bulgulara dayanarak litik infeksiyon fazındaki monositlerin virüs transmisyonu ile geç dönem nodüler lezyonlarda gözlenen HHV8 yükünün artması ve sürdürülmesinde önemli olduğu ileri sürülmüştür.

Bezold ve ark. (166) PCR ile Kaposi sarkomunda KSHV/HHV8 viral yükünü miktar olarak araştırdıkları çalışmada, viral yükün Kaposi sarkomunda göreceli düşük olduğunu ve HIV seropozitif ile seronegatif örneklerde farklılık göstermediğini saptamışlardır.

Kaposi sarkomunda hücre kökeni tartışmalıdır (50). Kaposi sarkomu iğsi hücrelerinin endotelial, düz kas veya indiferansiye mezenkimal kökenli olabileceği ileri sürülmüştür (167). Bu varsayımlar arasında endotelial hücrelerin Kaposi sarkomu iğsi hücrelerinin prekürsörü olduğu en ağırlıklı görüştür (111, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174). Erken lezyonlarda iğsi hücrelerin ortaya çıkmasından önce, KSHV/HHV8 ile infekte endotelial hücreler saptanmaktadır (34, 61, 128). KSHV/HHV8, endotelial hücrelerin infeksiyonunun doğrudan bir sonucu olarak, Kaposi sarkomu iğsi hücrelerinin gelişimine neden olabilir (175).

Ayrıca, parakrin uyarıların indüksiyonu da, etkilenmemiş diğer hücrelerden işi hücre gelişimini kolaylaştırılabilir (174, 176, 177, 178).

Endotel kökenli olduğu düşünülen işi hücrelerin, lenfatik veya kan damarlarının hangisinden kaynaklandığı konusu tartışmalıdır. Bu nedenle lenfanjiyogenez faktörü olarak bilinen VEGF-C ve reseptörleri VEGFR-2 (KDR) ile VEGFR-3'ün (Flt-4) Kaposi sarkomu patogeneziindeki yeri çalışmalara konu olmuştur (179). Kaposi sarkomu tümör hücrelerinde kuvvetli VEGFR-3 ekspresyonu, endotel hücre belirleyicisi CD31 ile koekspresyonu ve Kaposi sarkomu lezyonlarında lenfanjiyogenik faktör VEGF-C varlığı, Kaposi sarkomu tümör hücrelerinde lenfatik kökeni ve/veya diferansiyasyonu destekleyen bulgulardır (179). Aynı paralelde Kaposi sarkomu işi hücrelerinin lenfatik endotel spesifik belirleyicileri olan VEGFR-3 ve podoplanini yüksek miktarlarda eksprese etmeleri, işi hücrelerin lenfatik endotel kökenli olduğu varsayımını destekleyen bulgulardır (88, 111, 179).

Kaposi sarkomu işi hücrelerinin lenfatik endotel hücre belirleyicileri eksprese etmesi ve kültür ortamında KSHV/HHV8 ile infekte kan endotel hücrelerinde lenfatik belirleyicilerin ekspresyonunun artması nedeniyle, KSHV/HHV8'in in vivo ortamda kan endotel hücrelerinin diferansiyasyon yönünü değiştirerek, lenfatik endotel hücreleri yönünde diferansiye olmalarını sağladığı ileri sürülmüştür (92).

İn vitro VEGFR-3 aktivasyonunun endotel hücre migrasyon ve proliferasyonu ile KSHV/HHV8 enfeksiyonu ve KSHV/HHV8 bağımlı transformasyonu artırdığı gösterilmiştir (109). Bir çalışmada erken evre Kaposi sarkomunda LNA(+)/VEGFR-3(+) işi hücrelerde VEGFR-3 aktivasyonunun, Kaposi sarkomu gelişiminde endotel hücre toplanması, işi hücreye transformasyon ve patolojik vasküler yarı oluşmasını tetiklediği ileri sürülmüştür (180).

Çalışmamızda Kaposi sarkomu ve diğer vasküler lezyonlarda VEGFR-3 ekspresyonunun dağılımı araştırılarak, HHV8 varlığı ile paralellik gösterip göstermediği incelendi ve Kaposi sarkomu hücresinin kökeni hakkında ipucu elde edilmeye çalışıldı. Anti-VEGFR-3 antikor (klon KLT9) kullanılarak yapılan incelemede sadece 24/45 (%53,3) Kaposi sarkomu olgusunda pozitif immünreaktivite saptanırken, kontrol grubundaki olguların 28'inde (%62,2), vasküler lezyonların 26'sında (%61,9) immünreaktivite belirlendi.

Ayrıca, anti-VEGFR-3 antikoruyla tümör hücreleri ile birlikte ya da tümör hücrelerinde immünreaktivite izlenmeden sadece hemosiderinli makrofajlar, histiyositler, plazma hücreleri, mast hücreleri, stromal fibroblastlar, yağ ve ekrin ter bezlerinde, damar düz kas hücrelerinde, çizgili kas liflerinde, meme lobulusu normal duktal hücrelerinde de immünreaktivite saptandı. Bu immünreaktivitenin muhtemel çapraz reaksiyona bağlı olabileceği düşünüldü.

VEGFR-3 (klon 9D9F9) ekspresyonunun araştırıldığı bir çalışmada Folpe ve ark. tarafından 23/24 Kaposi sarkomu vakasında ekspresyon saptanmış ancak anjiyosarkom, Kaposiform hemanjiyoendotelyom, Dabska tümörü ve hemanjiyomlarda da değişen oranlarda ekspresyon gözlenmiştir (167). Epiteloid hemanjiyoendotelyom, piyojenik granülom, litoral anjiyom, staz dermatiti ile diğer lenfatik dışı normal dokular ve hücrelerde ekspresyon saptanmamıştır. Bu çalışmada lenfatik endotel diferansiyasyonu gösteren Kaposi sarkomu, Kaposiform hemanjiyoendotelyom ve Dabska tümöründe VEGFR-3 ekspresyonu saptanmasının oldukça duyarlı bir gösterge olduğu, ancak Kaposi sarkomunun diğer vasküler tümörlerden ayrımında özgül olmadığı sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda saptanan bulgular ile Folpe ve ark.'nın sonuçları arasındaki farklılığın nedeni kullanılan antikorun klonunun farklı olması olabilir.

Folpe ve ark. anti-VEGFR-3 ile tüm olgularda morfolojik olarak lenfatik veya küçük ven olduğunu düşündükleri normal vasküler boşluklarda pozitif immünreaksiyon saptarken, arter ve ven endotel hücreleri ile herhangi bir normal yapıda immünreaktivite gözlememişlerdir (167).

Dupin ve ark. Kaposi sarkomu nodüler lezyonlarda anti-VEGFR-3 antikorunu (klon 9D9) ile lenfatik endotel dağılımını araştırmışlar ve HHV8 LNA-1 ekspresyonu ile karşılaştırmışlardır. Patch ve plak lezyonlarda HHV8 LNA-1 ile az sayıdaki hücrenin pozitif olduğu ektazik damarları çevreleyen tüm işi hücrelerde, nodüler lezyonlarda ise işi hücrelerin %90'ından fazlasında pozitif reaksiyon saptamışlardır. HHV8 LNA-1'e benzer biçimde non-tümöral vasküler endotelde VEGFR-3 ile de reaksiyon görülmemiştir (10).

Erken Kaposi sarkomu lezyonlarında VEGFR-3'ün yaygın ekspresyonu, Kaposi sarkomunun lenfatik endotel veya immatür endotel hücrelerinin proliferasyonu olduğunu düşündürür niteliktedir (10). HHV8 ve VEGFR-3'ün erken ve geç Kaposi sarkomu lezyonlarında paralel dağılım göstermesi, HHV8'in lenfatik endotel ve lenfatik endotelden gelişen işi hücreleri infekte ettiğini ya da işi hücrelerde bu lenfatik belirleyicinin ekspresyonunu indüklediğini göstermektedir. Ancak erken lezyonlarda VEGFR-3'ün HHV8'den daha fazla hücrede eksprese edilmesi, HHV8'in VEGFR-3 ekspresyonunu doğrudan indüklediğini ve erken Kaposi sarkomu lezyonlarında VEGFR-3 pozitif hücre proliferasyonunu doğrudan tetiklemediğini düşündürmektedir (10).

Çalışmamızda ise anti-VEGFR-3 ile erken evre patch lezyonunda 2/4, plak lezyonunda 5/13, nodüler evrede 18/32 olguda pozitif reaksiyon belirlendi. VEGFR-3 ekspresyonu ile HHV8 ekspresyonunun paralellik göstermediği gözlemlendi. Erken evre patch ve plak lezyonlarında saptanan VEGFR-3 ekspresyonu, HHV8 ekspresyonundan daha düşük

oranlardaydı. Nodüler evre lezyonlarda ise VEGFR-3 eksprese eden hücre yüzdesi 5 olguda daha yüksek, 3 olguda aynı olup, 10 olguda daha düşük olarak saptandı.

Jussila ve ark. AIDS ile ilişkili nodüler Kaposi sarkomu vakalarında hem nodülü oluşturan içsi hücrelerde, hem de bunun çevresindeki dilate damarların endotelinde VEGFR-3 ekspresyonu saptamışlardır (111). Çalışmamızda ise nodülü oluşturan içsi hücreler dışında damar düz kası, inflamatuvar hücreler, ekrin ter bezi ve keratinositlerde VEGFR-3 ekspresyonu gözlenmiştir.

Partanen ve ark. (181) tarafından benign, borderline ve malign vasküler tümörlerde VEGFR-3 ekspresyonunun araştırıldığı bir çalışmada yaygın VEGFR-3 pozitifliği saptanması, bu belirleyicinin vasküler tümörlerde endotelial hücre diferansiyasyonunun bir göstergesi olarak kullanılabilceğini akla getirmektedir. Ancak araştırmacıların bu çalışmada elde ettikleri sonuçlar, VEGFR-3'ün lenfatik endotele özgül olmadığı yönündedir (181).

Lymboussaki ve ark. (112), dermal lenf damarları endotelinin VEGFR-3 ile boyanması yanısıra, kutanöz lenfanjiyomatozis olgularında endotelde kuvvetli pozitif, kutanöz hemanjiyomlarda endotel hücrelerinde zayıf pozitif VEGFR-3 ekspresyonu saptamışlardır. Bu nedenle deride lenfovasküler kanalların tespit edilmesi ve lenfatik veya kan vasküler endotelinden kaynaklanan deri lezyonlarının ayırıcı tanısında VEGFR-3 antikorunun yararlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamızda ise lenfatik endotel belirleyicisi anti-VEGFR-3 ile Kaposi sarkomu ayırıcı tanısına giren vasküler lezyonlardan lenfanjiyom (4/6) ve Kaposiform hemanjiyoendotelial (3/3) yanısıra, diğer vasküler lezyonlarda da (Masson hemanjiyomu (4/5), eozinofilili anjiyolenfoid hiperplazi (2/5), piyojenik granülom (4/4), kavernöz hemanjiyom (3/6) vb.) değişen oranlarda pozitiflik saptandı.

Kaposi sarkomu lezyonlarında saptanan VEGFR-3 ekspresyonunun diğer çalışmalara (10, 167) göre daha düşük oranlarda olması, çalışmamızda kullanılan anti-VEGFR-3 antikorunun farklı olması veya laboratuvar koşullarına bağlı olabilir. Ancak VEGFR-3 ile immünohistokimyasal incelemenin birçok kez tekrarlanmış olması ve her defasında pozitif kontrolde ekspresyon saptanması nedeniyle bir uygulama sorunu olmadığı düşünülmüştür.

Sonuç olarak, anti-VEGFR-3 ile saptanan %53,3 duyarlılık ve %37,8 özgüllük oranıyla Kaposi sarkomu kuşkusuz duyulan bir vasküler lezyonun doğru tanısı için VEGFR-3 ekspresyonunun güvenilir bir katkısı olamayacağı söylenebilir. Çalışmamızda anti-VEGFR-3 ile saptanan immünreaksiyonun vasküler tümörler arasında Kaposi sarkomuna özgül olmaması, Kaposi sarkomu içsi hücreleri ile sınırlı olmaması, lenfatik kökenli benign vasküler lezyonlarda spesifik bir immünreaksiyon saptanmaması nedeniyle, Kaposi

sarkomunun lenfatik endotel kökenli olduğu yolundaki literatür bilgilerini doğrulama olanağı vermemektedir.

Laboratuvarımızda ilk deneyimimiz olan in-situ hibridizasyonun farklı seanslarda gerçekleştirilmiş olması bir dezavantajdır. Ancak her seansta benzer biçimde reaktivite belirlenmiş olması, yöntemin uygulanmasında bir hata olmadığını ve kendi içinde tekrarlanabilir olduğunu düşündüren niteliktedir. Az sayıda hücrede reaktivite görülmesi, in-situ hibridizasyon yönteminde kullanılan probun litik fazda infekte hücrelerden eksprese edilen T1.1 mRNA'ya karşı hazırlanmış bir prob olması ve doku fiksasyonu ile saklama koşullarının RNA degradasyonuna yol açmasına bağlı olabilir.

Çalışmada kullanılan anti-HHV8 LNA-1 antikoru ile Kaposi sarkomu olgularının tümünde (%100) immünreaktivite saptanırken, in-situ hibridizasyonda Kaposi sarkomu olgularının 29'unda (%64,4) pozitif reaktivite belirlenmiştir. Ayrıca immünohistokimyasal yöntemle vasküler lezyonların hiçbirinde reaktivite izlenmemesi nedeniyle, rutin uygulamada tanının doğrulanması ve ayırıcı tanıda kullanılmak amacıyla bu yöntemin daha başarılı olduğu söylenebilir.

Yoğun iş gücü gerektirmemesi, daha kısa zamanda ve daha kolay uygulanabilen bir yöntem olmasının yanısıra, pozitif reaksiyon değerlendirmesinin daha kolay olması nedeniyle, Kaposi sarkomunda HHV8 varlığı saptanması amacıyla immünohistokimyasal incelemenin in-situ hibridizasyona göre üstünlükleri olduğu sonucuna varılmıştır.

SONUÇLAR

- İ. Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında Ocak 2001-Mart 2006 tarihleri arasında incelenen 64 Kaposi sarkomu olgusundan çalışma kapsamına alınan 45 olgunun %69'unun klasik tip, %26,6'sının transplantasyon veya iyatrojenik immünsüpresyon ile birlikte görülen tip, %4,4'ünün AIDS-asosiyeli tipten oluştuğu belirlendi.
- Kaposi sarkomu olgularında yaş erkeklerde 21 ile 97, kadınlarda 3 ile 78 arasında değişmekteydi. Yaş ortalaması erkeklerde $59,46 \pm 16,67$, kadınlarda ise $59,65 \pm 20,33$ olarak hesaplandı. Klasik Kaposi sarkomu olgularında yaş 3 ile 97, transplantasyon veya iyatrojenik immünsüpresyon ile birlikte görülen Kaposi sarkomu olgularında ise 34 ile 78 arasında değişmekteydi.
- Kaposi sarkomu olgularının %62,2'si erkek, %37,8'i kadın olup, klasik Kaposi sarkomu ve transplantasyon veya iyatrojenik immünsüpresyon ile birlikte görülen Kaposi sarkomu olgularında erkek:kadın oranının sırasıyla 2,4:1 ve 1:2 olduğu belirlendi.
- İki farklı dönem lezyonu incelenen 2 Kaposi sarkomu olgusunda lezyonlar bir olguda ağız mukozası ve üst ekstremiteler, diğerinde göğüs ve alt ekstremiteler yerleşmişti. Diğer 43 olguda alt ekstremiteler (%65,1) ilk sırada olup, bunu üst ekstremiteler (%11,6), baş-boyun (%9,3), gövde (%4,7), penis (%4,7), ağız mukozası (%2,3) ve lenf gangliyonu (%2,3) lokalizasyonları izlenmekteydi.
- Klasik Kaposi sarkomunda en sık gözlenen lokalizasyonlar sırasıyla alt ekstremiteler (%67,8), baş-boyun (%13), üst ekstremiteler (%6,4), gövde (%6,4) ve penis (%6,4) idi. HIV pozitifliğinin eşlik ettiği iki hastada lezyonlar üst ekstremiteler yerleşmişti.
- Transplantasyon veya iyatrojenik immünsüpresyon ile birlikte görülen Kaposi sarkomunda ise lezyonlar 7 olguda (%58,5) alt ekstremiteler, 1 olguda (%8,3) ağız mukozası ve üst ekstremiteler, 1 olguda (%8,3) göğüs ve alt ekstremiteler, 1'er olguda (%8,3) ağız mukozası, üst ekstremiteler ve lenf gangliyonu yerleşmişti.

- Kaposi sarkomu lezyonları, dört olguda iki ayrı evrede lezyon mevcut olmak üzere, toplam 4 (%8,2) yama (patch), 13 (%26,5) plak ve 32 (%65,3) nodül evresi lezyondan oluşmaktaydı.
- Anti-HHV8 antikorunu kullanılarak yapılan incelemede Kaposi sarkomu olgularının tümünde (%100) immünreaktivite saptanırken, kontrol grubundaki vasküler lezyonlar ile Kaposi sarkomuyla eş zamanlı olarak farklı bir vücut bölgesinden eksize edilen nörofibrom ve 2 hastanın nedbe dokusunda immünreaktivite görülmedi. Bu sonuçlarla HHV8 LNA-1 reaktivitesinin Kaposi sarkomu için %100 duyarlı ve özgül bir yöntem olduğu belirlendi. HHV8 LNA-1 reaktivitesinin lezyonlu dokuyla ve lezyonu oluşturan iğsi hücrelerle sınırlı olması, KSHV/HHV8'in patogeneizde önemli rol oynadığı yolundaki literatür bilgilerini destekleyen niteliktedir.
- Kaposi sarkomu olgularında HHV8 LNA-1 reaktivitesi açısından yama (patch) evresinde $37,75 \pm 28,28$, plak evresinde $17,8 \pm 14,02$, nodül evresinde ise $33 \pm 16,97$ olarak belirlenen ortalama skor ile evrelerin karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı.
- İn-situ hibridizasyon yöntemi ile HHV8 reaktivitesi Kaposi sarkomu olgularının %64,4'ünde saptandı. Saptanan en yoğun reaktivite bile hücrelerin sadece %1'i düzeyindeydi. Diğer tüm pozitif olgularda bu oran %1'in altında idi. Farklı dönem lezyonları ile incelenen 4 Kaposi sarkomu olgusunda in-situ hibridizasyon sonuçları dönemler arası farklılık göstermedi. İn-situ hibridizasyon yönteminde duyarlılık, özgüllük ve doğruluk oranı sırasıyla %64,4, %97,8 ve %81,1 olarak saptandı.
- İmmünohistokimyasal inceleme, yoğun iş gücü gerektirmemesi, daha kısa zamanda uygulanabilmesi, daha basit bir yöntem olması, pozitif hücrelerin değerlendirilmesinin daha kolay olması ve çalışmamızda saptanan yüksek özgüllük ve duyarlılık oranlarıyla, in-situ hibridizasyondan daha üstün bir yöntem olarak kabul edilebilir.

- Anti-VEGFR-3 antikorunu kullanarak yapılan incelemede Kaposi sarkomu olgularının %53,3'ünde, kontrol grubundaki tüm lezyonların %62,2'sinde, vasküler lezyonların %61,9'unda pozitif immünreaktivite belirlendi. Anti-VEGFR-3 için sırasıyla %53,3, %37,8 ve %45,5 olarak hesaplanan duyarlılık, özgüllük ve doğruluk oranlarıyla VEGFR-3 antikoruyla immünohistokimyasal incelemenin Kaposi sarkomu kuşkusu duyulan bir vasküler lezyonun doğru tanısı için güvenilir bir yöntem olmadığı sonucuna varıldı.
- Kaposi sarkomu olguları ile kontrol grubunu oluşturan olgular arasında VEGFR-3 skorları açısından anlamlı farklılık saptanmadı ($z=35$, $p=0,720$). Lenfanjiyom olguları ile diğer vasküler lezyonlar ($z=0,54$, $p=0,589$) ve Kaposi sarkomu olguları ($z=0,10$, $p=0,920$) arasında da VEGFR-3 skorları açısından istatistiksel anlamlı farklılık görülmedi.
- Çalışmamızda anti-VEGFR-3 ile saptanan immünreaksiyonun vasküler tümörler arasında Kaposi sarkomuna spesifik olmaması ve Kaposi sarkomu iğsi hücreleri ile sınırlı olmaması nedeniyle VEGFR-3 reaktivitesinin Kaposi sarkomuna özgül olmadığı belirlendi. Kaposi sarkomunun lenfatik endotel kökenli olduğunu belirten kaynak bilgilerini destekleyebilecek sonuçlar saptanmadı.

ÖZET

Kaposi sarkomu bir asır önce tanımlanmasına rağmen, biyolojisi hala karanlık noktalar içermektedir. Kaposi sarkomu farklı klinik ve epidemiyolojik tipleri olan anjiyoproliferatif bir hastalıktır: Bunlar klasik, endemik, transplantasyon veya iyatrojenik immünsüpresyon ile birlikte görülen ve AIDS-asosiye tiplerdir. Kaposi sarkomunun tüm tiplerinde aynı histolojik özellikler izlenir. Epidemiyolojik bulgular, coğrafik dağılım ve hastalığın seyrinin immünite durumu ile ilişkili olması, Kaposi sarkomu etyolojisinde infeksiyöz bir ajanın rol oynadığını düşündürmüştür. 1994 yılında human herpesvirus 8 (HHV8) veya Kaposi sarcoma associated herpesvirus (KSHV) olarak bilinen yeni bir virüs tanımlanmıştır. KSHV/HHV8 DNA'sı klinik/epidemiyolojik şekli ve evresi ne olursa olsun, tüm Kaposi sarkomu lezyonlarında saptanmıştır.

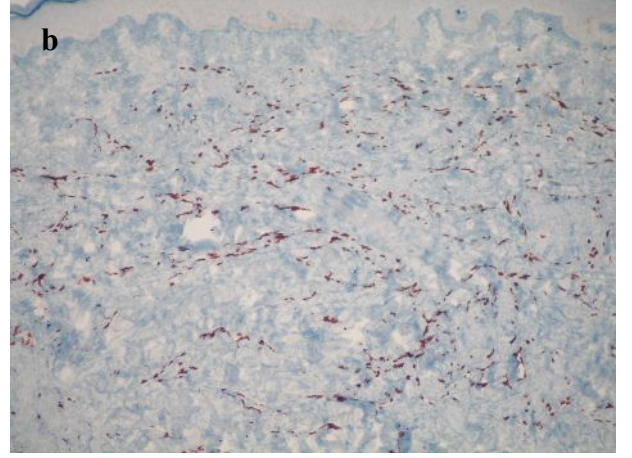
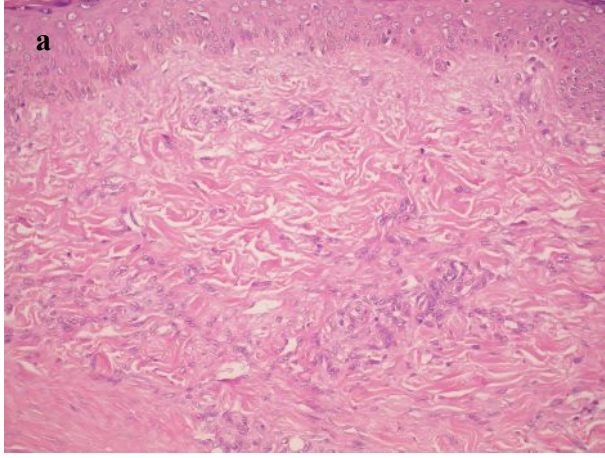
Kaposi sarkomu iğsi hücrelerinin lenfatik veya kan damarı endoteli kökenli olup olmadıkları tartışmalıdır. Kaposi sarkomu iğsi hücrelerinde VEGFR-3 (vascular endothelial growth factor receptor type 3) ve podoplanin ekspresyonu saptanması nedeniyle, bu hücrelerin lenfatik endotel kökenli olduğu ileri sürülmektedir.

Bu çalışmanın amacı Kaposi sarkomu ve ayırıcı tanıya girebilecek diğer vasküler lezyonlarda immünhistokimyasal yöntem ve in-situ hibridizasyon ile HHV8 varlığını araştırmaktır. Ayrıca, lenfatik endotele özgü VEGFR-3 ekspresyonu araştırılarak Kaposi sarkomu hücre kökeni hakkında veriler elde edilmeye çalışılmıştır.

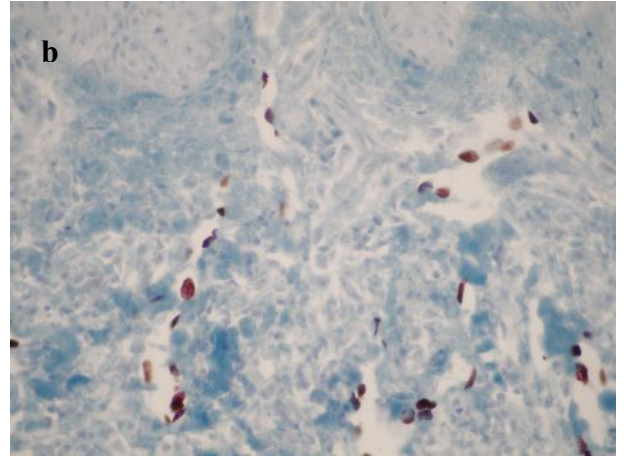
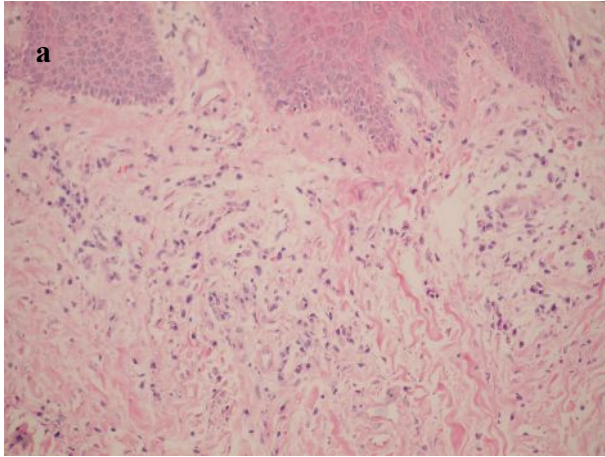
Bu çalışmada 45 Kaposi sarkomu ve diğer vasküler lezyonlara ait 45 olgu olmak üzere toplam 90 olgu incelendi. Kaposi sarkomu olgularının tümünde iğsi hücrelerde ve yarıklar tarzındaki patolojik damarları döşeyen endotel kökenli hücrelerde anti-HHV8 LNA-1 ile çekirdek immünreaktivitesi saptanırken, diğer 45 vasküler lezyonda reaktivite görülmedi. İn-situ hibridizasyon yönteminde Kaposi sarkomu olgularının sadece 29'unda pozitif reaksiyon saptandı. Anti-VEGFR-3 ile Kaposi sarkomu olgularının 24/45'inde, diğer vasküler lezyonların 28/45'inde pozitif immünreaktivite gözlemlendi.

Sonuç olarak, anti-VEGFR-3 ile saptanan immünreaksiyonun vasküler tümörler arasında Kaposi sarkomu ve Kaposi sarkomu iğsi hücreleriyle sınırlı olmaması nedeniyle VEGFR-3 ekspresyonunun Kaposi sarkomuna özgül olmadığı söylenebilir. Ayrıca, elde edilen bulgular Kaposi sarkomu hücrelerinin lenfatik endotel kökenli olduğu yönündeki hipotezi doğrulama olanağı vermedi. HHV8 LNA-1 immünhistokimyasal incelemesi in-situ hibridizasyona göre daha yüksek oranda özgül ve duyarlı bir metod olup, konvansiyonel histopatolojiye ek olarak Kaposi sarkomu tanısında yararlı olabilecek basit bir yöntemdir.

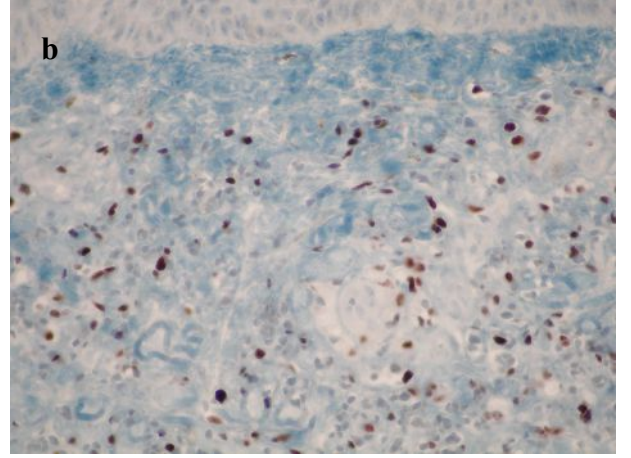
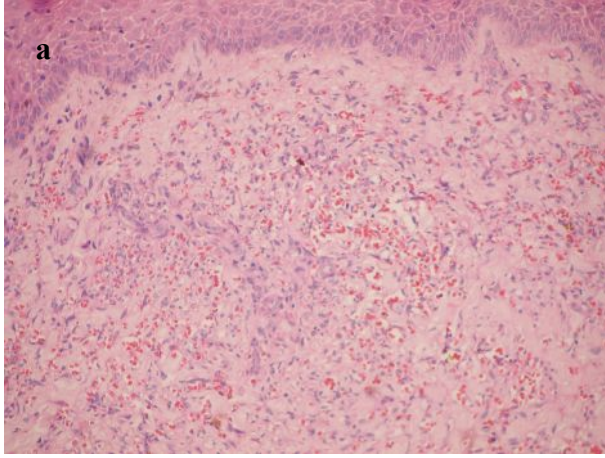
RESİMLER



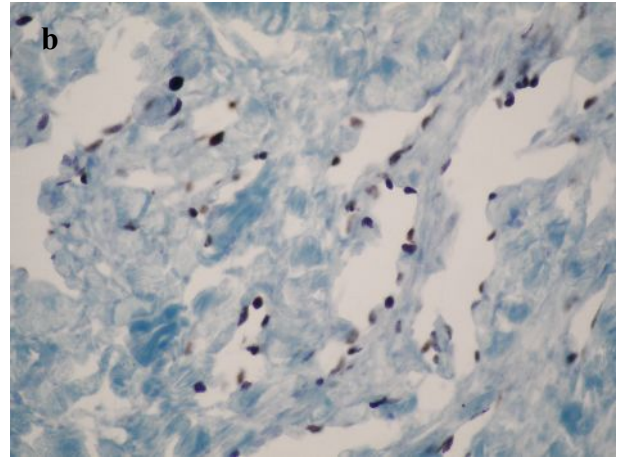
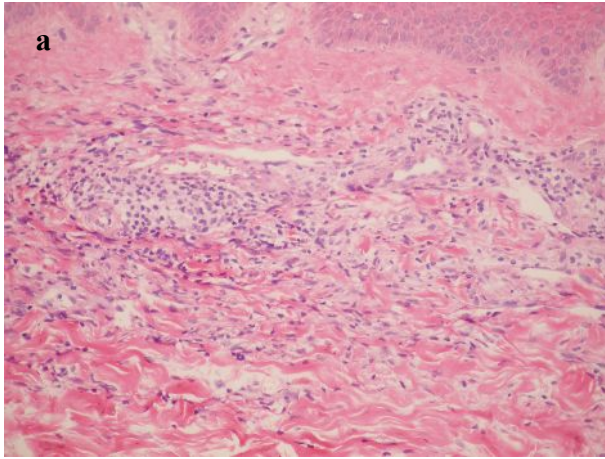
Resim 1: **a**-Yüzeyel ve orta dermiste küçük çaplı damar sayısında artış, kollajen demetler arasında vasküler karakterli olduğu izlenimi uyandıran yarık ve ayrışmalar (Olgu 44, Kaposi sarkomu, H.-E. x40), **b**-Anti-HHV8 antikoruyla immünreaktivite gösteren endotelial hücreler (Olgu 44, Kaposi sarkomu, anti-HHV8 x40).



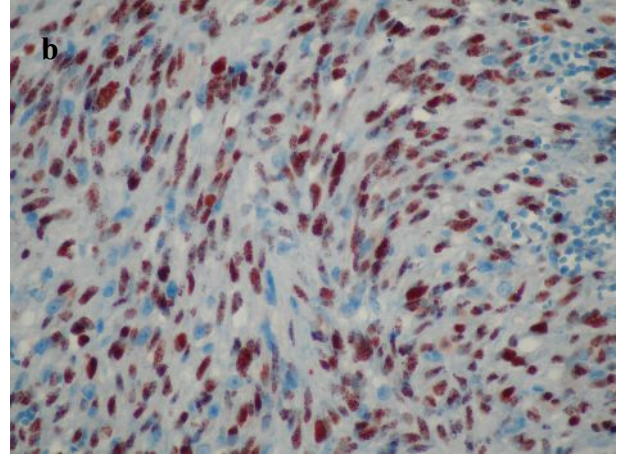
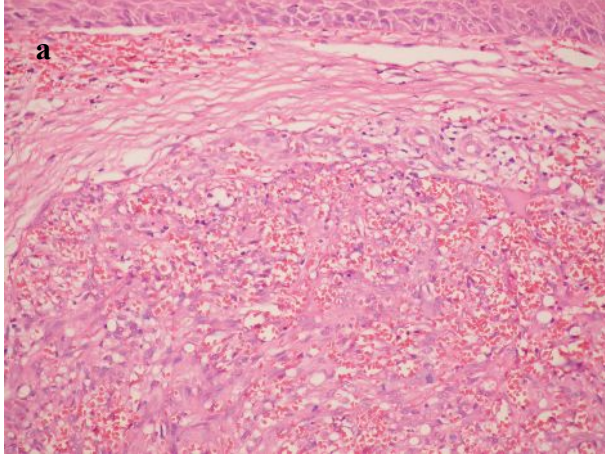
Resim 2: **a**-Yarık tarzında patolojik damar oluşumu, seyrek eritrosit ekstravazasyonu (Olgu 15, Kaposi sarkomu, H.-E. x40), **b**-Anti-HHV8 antikoruyla yarıkları döşeyen endotelial hücrelerde çekirdek immünreaktivitesi (Olgu 15, Kaposi sarkomu, anti-HHV8 x100).



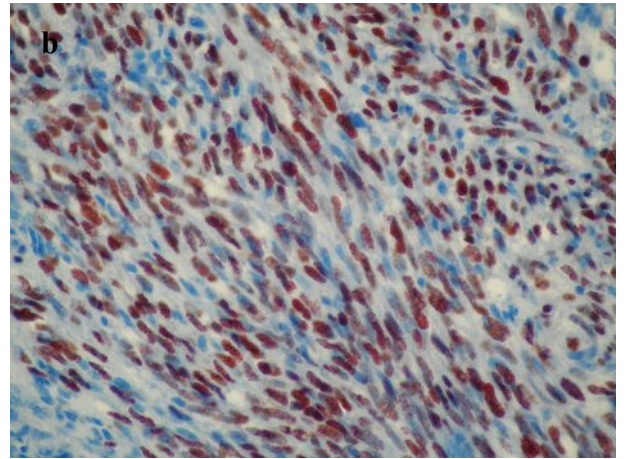
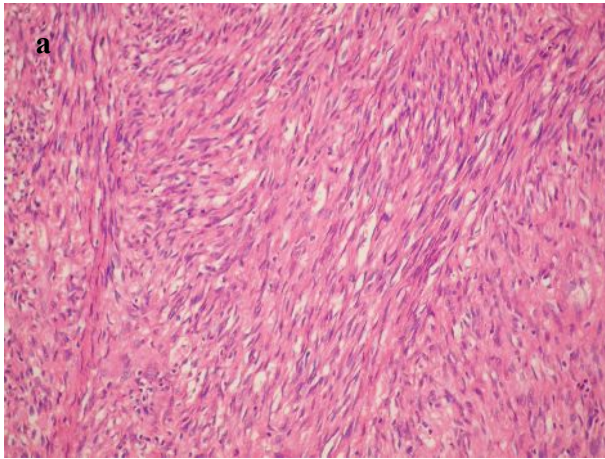
Resim 3: **a-**Tüm papiller dermisi kaplayan bölgede küçük yarıklar tarzında patolojik vaskülarizasyon, yaygın eritrosit ekstravazasyonu (Olgu 13, Kaposi sarkomu, H.-E. x40), **b-**Anti-HHV8 antikoruyla iğsi şekilli endotel hücrelerinde immünreaktivite (Olgu 13, Kaposi sarkomu, anti-HHV8 x40).



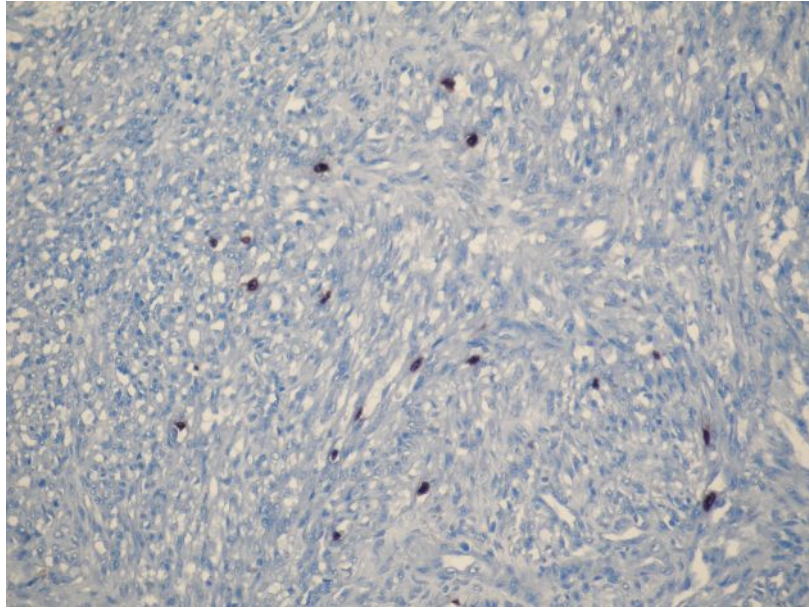
Resim 4: **a-**Papiller dermiste küçük çaplı damarlar çevresinde yarıklar tarzında patolojik damarlanma (Olgu 19, Kaposi sarkomu, H.-E. x40), **b-**Anti-HHV8 antikoruyla yarıklar tarzında patolojik damarları döşeyen hücrelerde kuvvetli çekirdek immünreaktivitesi (Olgu 19, Kaposi sarkomu, anti-HHV8 x100).



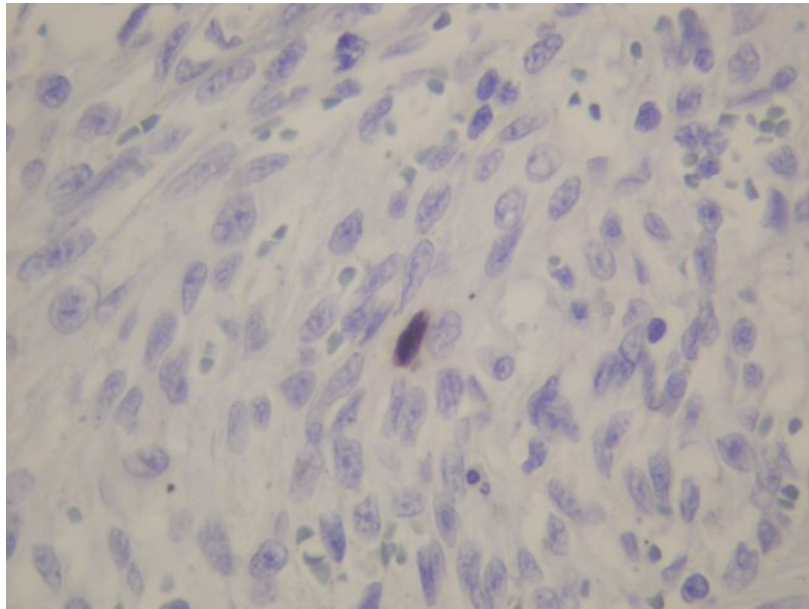
Resim 5: **a-**Nodüler karakterli, iğsi hücrelerden oluşan lezyonda yoğun eritrosit ekstrasvazasyonu (Olgu 38, Kaposi sarkomu, H.-E. x40), **b-**Anti-HHV8 antikoruyla orta şiddette çekirdek immünreaktivitesi (Olgu 38, Kaposi sarkomu, anti-HHV8 x400).



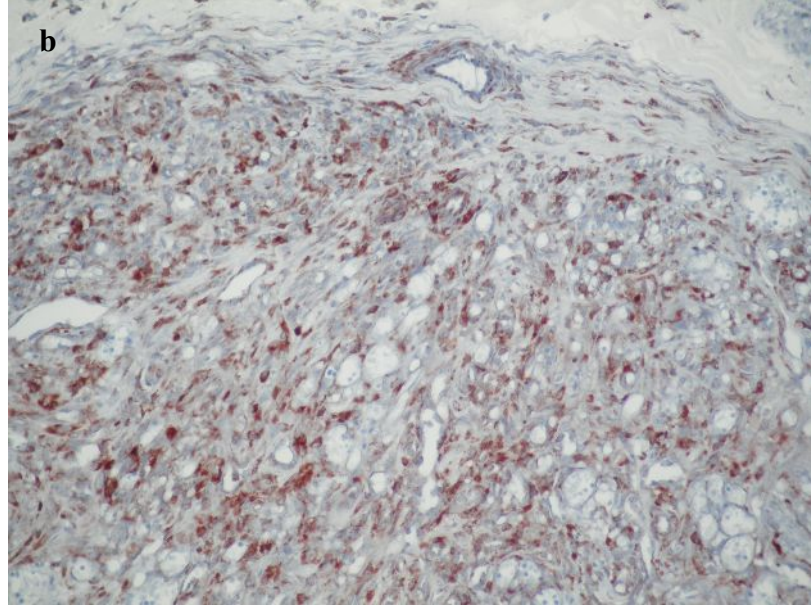
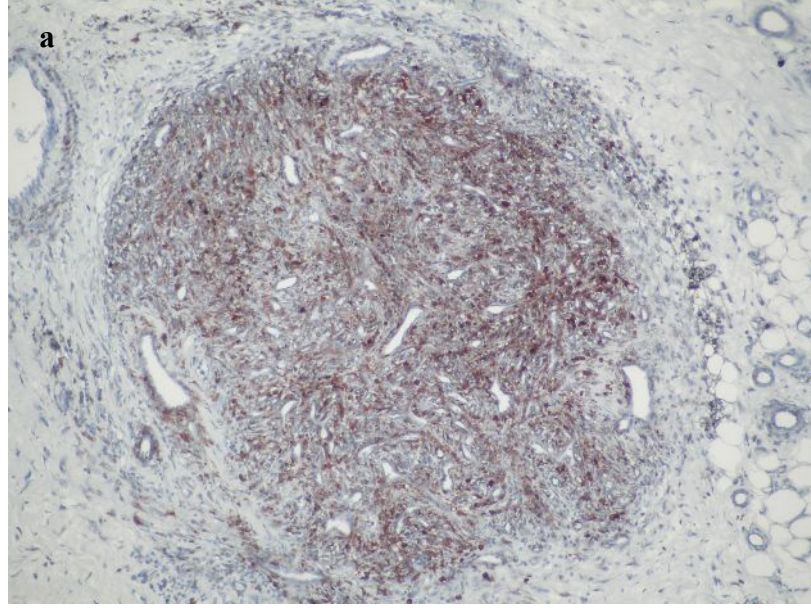
Resim 6: **a-**Prolifere olan iğsi hücrelerin oluşturduğu demet yapılarından meydana gelen nodüler tümör yapısı (Olgu 14, Kaposi sarkomu, H.-E. x400), **b-**Anti-HHV8 antikoruyla hücrelerin %76-100'ünde kuvvetli çekirdek immünreaktivitesi (Olgu 14, Kaposi sarkomu, anti-HHV8 x400).



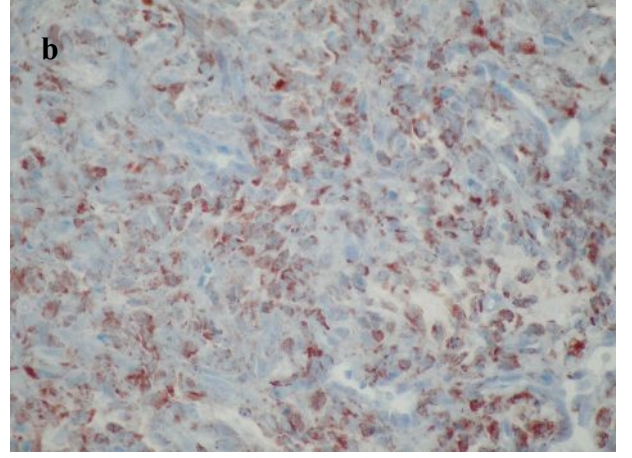
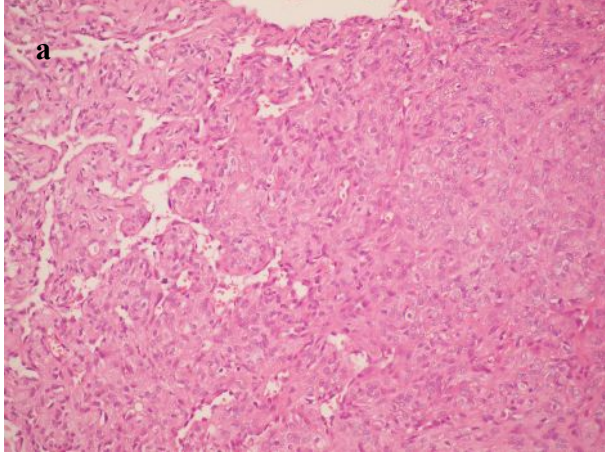
Resim 7: HHV8 in-situ hibridizasyon incelemede az sayıda hücrede çekirdek reaktivitesi (Olgu 45, Kaposi sarkomu, in-situ HHV8 x100).



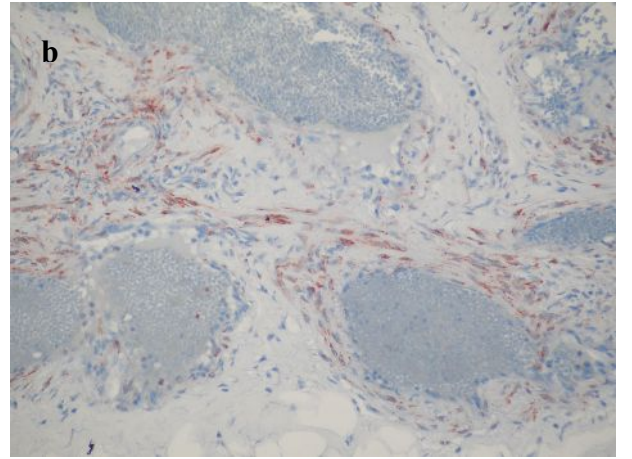
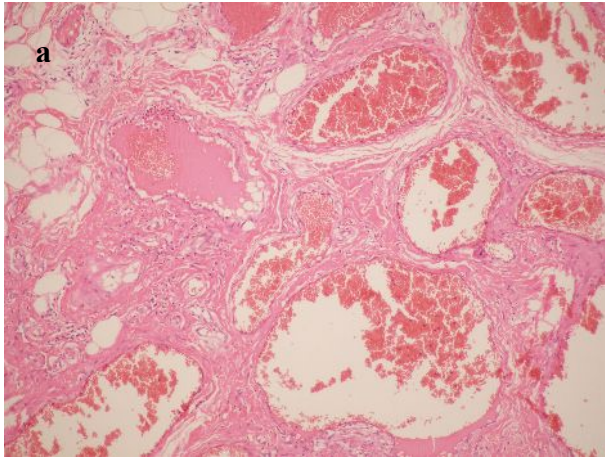
Resim 8: HHV8 in-situ hibridizasyon incelemede çekirdek reaktivitesi (Olgu 42, Kaposi sarkomu, in-situ HHV8 x400).



Resim 9: a-b-Nodüler gelişme gösteren, içi hücreli demet yapılarından oluşan yarıık tarzında damar yapılarında anti-VEGFR-3 antikoruyla sitoplazmik immünreaktivite (Olgu 10, Kaposi sarkomu, anti-VEGFR-3 x40, x100).



Resim 10: a-Yer yer iğsi hücreler içeren epitelioid hücre topluluklarından oluşan lezyon (Olgu 39, infantil hemanjiyom, H.-E. x40), **b-**Anti-VEGFR-3 antikoruyla sitoplazmik immünreaktivite (Olgu 39, infantil hemanjiyom, anti-VEGFR-3 x100).



Resim 11: a-Yassı endotelial hücreler ile döşeli geniş damar yapıları (Olgu 31, kavernöz hemanjiyom, H.-E. x40), **b-**Anti-VEGFR-3 antikoruyla damar duvarı çevresi iğsi hücrelerde immünreaktivite (Olgu 31, kavernöz hemanjiyom, anti-VEGFR-3 x40).

KAYNAKLAR

1. Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, Stuschke M, Roggendorf M, Schwartz RA, Seeber S. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy. *Lancet Infect Dis* 2002;2(5):281-292.
2. Ensoli B, Sgadari C, Barillari G, Sirianni MC, Sturzl M, Monini P. Biology of Kaposi's sarcoma. *Eur J Cancer* 2001;37(10):1251-1269.
3. Ensoli B, Sturzl M, Monini P. Cytokine-mediated growth promotion of Kaposi's sarcoma and primary effusion lymphoma. *Semin Cancer Biol* 2000;10(5):367-381.
4. Iscovich J, Boffetta P, Franceschi S, Azizi E, Sarid R. Classic kaposi sarcoma: epidemiology and risk factors. *Cancer* 2000;88(3):500-517.
5. Cheuk W, Wong KO, Wong CS, Dinkel JE, Ben-Dor D, Chan JK. Immunostaining for human herpesvirus 8 latent nuclear antigen-1 helps distinguish Kaposi sarcoma from its mimickers. *Am J Clin Pathol* 2004;121(3):335-342.
6. Patel RM, Goldblum JR, Hsi ED. Immunohistochemical detection of human herpes virus-8 latent nuclear antigen-1 is useful in the diagnosis of Kaposi sarcoma. *Mod Pathol* 2004;17(4):456-460.
7. Robin YM, Guillou L, Michels JJ, Coindre JM. Human herpesvirus 8 immunostaining: a sensitive and specific method for diagnosing Kaposi sarcoma in paraffin-embedded sections. *Am J Clin Pathol* 2004;121(3):330-334.
8. Schwartz EJ, Dorfman RF, Kohler S. Human herpesvirus-8 latent nuclear antigen-1 expression in endemic Kaposi sarcoma: an immunohistochemical study of 16 cases. *Am J Surg Pathol* 2003;27(12):1546-1550.
9. Hong A, Davies S, Lee CS. Immunohistochemical detection of the human herpes virus 8 (HHV8) latent nuclear antigen-1 in Kaposi's sarcoma. *Pathology* 2003;35(5):448-450.
10. Dupin N, Fisher C, Kellam P, Ariad S, Tulliez M, Franck N, van Marck E, Salmon D, Gorin I, Escande JP, Weiss RA, Alitalo K, Boshoff C. Distribution of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease, and primary effusion lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(8):4546-4551.
11. Courville P, Simon F, Le Pessot F, Tallet Y, Debab Y, Metayer J. Detection of HHV8 latent nuclear antigen by immunohistochemistry. A new tool for differentiating Kaposi's sarcoma from its mimics. *Ann Pathol* 2002;22(4):267-276.
12. Plancoulaine S, Gessain A. Epidemiological aspects of human herpesvirus 8 infection and of Kaposi's sarcoma. *Med Mal Infect* 2005;35(5):314-321.
13. Kaposi M. Idiopathisches multiples Pigmentsarkom der Haut. *Archiv für Dermatologie und Syphilis* 1872;2:265-273.
14. Schwartz RA. Kaposi sarcoma. *eMedicine* 2006 May 11 (19 Ocak 2007). URL:<http://www.emedicine.com/derm/topic203.htm>.
15. Schwartz RA. Kaposi's sarcoma: an update. *J Surg Oncol* 2004;87(3):146-151.
16. McKee PH, Calonje E, Granter SR. Kaposi sarcoma. In: McKee PH, Calonje E, Granter SR, eds. *Pathology of the skin with clinical correlations*. 3rd ed. Volume 2. UK: Elsevier Mosby; 2005. p. 1830-1836.
17. Brooks LA, Wilson AJ, Crook T. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)/human herpesvirus 8 (HHV8)--a new human tumour virus. *J Pathol* 1997;182(3):262-265.

18. Kempf W, Adams V. Viruses in the pathogenesis of Kaposi's sarcoma--a review. *Biochem Mol Med* 1996;58(1):1-12.
19. Buonaguro FM, Tomesello ML, Buonaguro L, Satriano RA, Ruocco E, Castello G, Ruocco V. Kaposi's sarcoma: aetiopathogenesis, histology and clinical features. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003;17(2):138-154.
20. Boshoff C, Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: a new DNA tumor virus. *Annu Rev Med* 2001;52:453-470.
21. Boshoff C. Kaposi's sarcoma biology. *IUBMB Life* 2002;53(4-5):259-261.
22. Cannon M, Cesarman E. Kaposi's sarcoma-associated herpes virus and acquired immunodeficiency syndrome-related malignancy. *Semin Oncol* 2000;27(4):409-419.
23. Zalla MJ. Kaposi's sarcoma. An update. *Dermatol Surg* 1996;22(3):274-287.
24. Schulz TF. The pleiotropic effects of Kaposi's sarcoma herpesvirus. *J Pathol* 2006;208(2):187-198.
25. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994;266(5192):1865-1869.
26. Neipel F, Fleckenstein B. The role of HHV-8 in Kaposi's sarcoma. *Semin Cancer Biol* 1999;9(3):151-164.
27. Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 2000;342(14):1027-1038.
28. Moore PS. The emergence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8). *N Engl J Med* 2000;343(19):1411-1413.
29. Ablashi DV, Chatlynne LG, Whitman JE Jr, Cesarman E. Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8, diseases. *Clin Microbiol Rev* 2002;15(3):439-464.
30. Dilnur P, Katano H, Wang ZH, Osakabe Y, Kudo M, Sata T, Ebihara Y. Classic type of Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 infection in Xinjiang, China. *Pathol Int* 2001;51(11):845-852.
31. Dupin N, Calvez V. HHV-8/KSHV. II--Associated diseases. *Ann Dermatol Venereol* 2000;127(6-7):633-637.
32. Lennette ET, Blackbourn DJ, Levy JA. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* 1996;348(9031):858-861.
33. Sarmati L. Serological testing for human herpesvirus 8. *Herpes* 2001;8(3):76-79.
34. Staskus KA, Zhong W, Gebhard K, Herndier B, Wang H, Renne R, Beneke J, Pudney J, Anderson DJ, Ganem D, Haase AT. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells. *J Virol* 1997;71(1):715-719.
35. Corbellino M, Poirel L, Bestetti G, Pizzuto M, Aubin JT, Capra M, Bifulco C, Berti E, Agut H, Rizzardini G, Galli M, Parravicini C. Restricted tissue distribution of extralesional Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS patients with Kaposi's sarcoma. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996;12(8):651-657.
36. Gill J, Powles T, Bower M. The molecular genetics of human herpesvirus 8. *Hosp Med* 2000;61(5):306-309.
37. Calonje E, Wilson-Jones E. Vascular Tumors: Tumors and tumor-like conditions of blood vessels and lymphatics. In: Elder DE, ed. *Lever's histopathology of the skin*. 9th ed. Philadelphia: Lipincott Williams&Wilkins; 2005. p. 1014-1059.

38. Weedon D. Vascular tumors. Chapter 38. In: Weedon D, ed. *Skin Pathology*. 2nd ed. London, Edinburgh, New York: Churchill-Livingstone; 2002. p. 1001-1043.
39. Aboulafia DM. Kaposi's sarcoma. *Clin Dermatol* 2001;19(3):269-283.
40. Schoen FJ. Blood vessels. Chapter 11. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, eds. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7th Ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2005. p. 511-554.
41. Schwartz RA. Kaposi's sarcoma: advances and perspectives. *J Am Acad Dermatol* 1996;34(5 Pt 1):804-814.
42. Hunt SJ, Santa DJ, Barnhill R. Vascular tumors. Chapter 31. In: Barnhill RL, Crowson AN, eds. *Textbook of Dermatopathology*. 2nd ed. New York, Chicago, San Francisco: McGraw-Hill; 2004. p. 821-870.
43. Pedagogos E, Nicholls K, Dowling J, Becker G. Kaposi's sarcoma post renal transplantation. *Aust N Z J Med* 1994;24(6):722-723.
44. Montagnino G, Bencini PL, Tarantino A, Caputo R, Ponticelli C. Clinical features and course of Kaposi's sarcoma in kidney transplant patients: report of 13 cases. *Am J Nephrol* 1994;14(2):121-126.
45. Frances C, Farge D, Desruennes M, Boisnic S. Maladie de Kaposi des transplantés cardiaques. *Ann Dermatol Venereol* 1991;118(11):864-866.
46. Dreno B. Skin cancers after transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18(6):1052-1058.
47. Beral V, Newton R. Overview of the epidemiology of immunodeficiency-associated cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1998;(23):1-6.
48. Jensen KK, Lira SA. Chemokines and Kaposi's sarcoma. *Semin Cancer Biol* 2004;14(3):187-194.
49. Gallo RC. The enigmas of Kaposi's sarcoma. *Science* 1998;282(5395):1837-1839.
50. Jenner RG, Boshoff C. The molecular pathology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Biochim Biophys Acta* 2002;1602(1):1-22.
51. Ensoli B, Sturzl M. Kaposi's sarcoma: a result of the interplay among inflammatory cytokines, angiogenic factors and viral agents. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;9(1):63-83.
52. Nickoloff BJ, Foreman KE. Etiology and pathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Recent Results Cancer Res* 2002;160:332-342.
53. Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, Parry JP, Peruzzi D, Edelman IS, Chang Y, Moore PS. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(25):14862-14867.
54. Cathomas G. Human herpes virus 8: a new virus discloses its face. *Virchows Arch* 2000;436(3):195-206.
55. Geraminejad P, Memar O, Aronson I, Rady PL, Hengge U, Tyring SK. Kaposi's sarcoma and other manifestations of human herpesvirus 8. *J Am Acad Dermatol* 2002;47(5):641-655.
56. Zhong W, Wang H, Herndier B, Ganem D. Restricted expression of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genes in Kaposi sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(13):6641-6646.
57. Schulz TF. KSHV (HHV8) infection. *J Infect* 2000;41(2):125-129.
58. Direkze S, Laman H. Regulation of growth signalling and cell cycle by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genes. *Int J Exp Pathol* 2004;85(6):305-319.

59. Friborg J Jr, Kong W, Hottiger MO, Nabel GJ. p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature* 1999;402(6764):889-894.
60. Radkov SA, Kellam P, Boshoff C. The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. *Nat Med* 2000;6(10):1121-1127.
61. Sturzl M, Blasig C, Schreier A, Neipel F, Hohenadl C, Cornali E, Ascherl G, Esser S, Brockmeyer NH, Ekman M, Kaaya EE, Tschachler E, Biberfeld P. Expression of HHV-8 latency-associated T0.7 RNA in spindle cells and endothelial cells of AIDS-associated, classical and African Kaposi's sarcoma. *Int J Cancer* 1997;72(1):68-71.
62. Sturzl M, Wunderlich A, Ascherl G, Hohenadl C, Monini P, Zietz C, Browning PJ, Neipel F, Biberfeld P, Ensoli B. Human herpesvirus-8 (HHV-8) gene expression in Kaposi's sarcoma (KS) primary lesions: an in situ hybridization study. *Leukemia* 1999;13 Suppl 1:S110-112.
63. Bubman D, Cesarman E. Pathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2003;17(3):717-745.
64. Cesarman E, Mesri EA, Gershengorn MC. Viral G protein-coupled receptor and Kaposi's sarcoma: a model of paracrine neoplasia? *Exp Med* 2000;191(3):417-422.
65. Damania B, Jung JU. Comparative analysis of the transforming mechanisms of Epstein-Barr virus, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, and Herpesvirus saimiri. *Adv Cancer Res* 2001;80:51-82.
66. Hong A, Lee CS. The emerging role of the human herpesvirus 8 (HHV8) in human neoplasia. *Pathology* 2001;33(4):461-468.
67. Arvanitakis L, Geras-Raaka E, Varma A, Gershengorn MC, Cesarman E. Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature* 1997;385(6614):347-350.
68. Cathomas G. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)/human herpesvirus 8 (HHV-8) as a tumour virus. *Herpes* 2003;10(3):72-77.
69. Boshoff C, Endo Y, Collins PD, Takeuchi Y, Reeves JD, Schweickart VL, Siani MA, Sasaki T, Williams TJ, Gray PW, Moore PS, Chang Y, Weiss RA. Angiogenic and HIV-inhibitory functions of KSHV-encoded chemokines. *Science* 1997;278(5336):290-294.
70. Jenner RG, Alba MM, Boshoff C, Kellam P. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent and lytic gene expression as revealed by DNA arrays. *J Virol* 2001;75(2):891-902.
71. Aoki Y, Tosato G. Pathogenesis and manifestations of human herpesvirus-8-associated disorders. *Semin Hematol* 2003;40(2):143-153.
72. Foreman KE. Kaposi's sarcoma: the role of HHV-8 and HIV-1 in pathogenesis. *Expert Rev Mol Med* 2001;2001:1-17.
73. Barillari G, Ensoli B. Angiogenic effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and its role in the pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Clin Microbiol Rev* 2002;15(2):310-326.
74. Delli Bovi P, Donti E, Knowles DM 2nd, Friedman-Kien A, Luciw PA, Dina D, Dalla-Favera R, Basilico C. Presence of chromosomal abnormalities and lack of AIDS retrovirus DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Cancer Res* 1986;46(12 Pt 1):6333-6338.
75. Dourmishev LA, Dourmishev AL, Palmeri D, Schwartz RA, Lukac DM. Molecular genetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) epidemiology and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003;67(2):175-212.

76. Gallo RC. Some aspects of the pathogenesis of HIV-1-associated Kaposi's sarcoma. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1998;(23):55-57.
77. Reitz MS Jr, Nerurkar LS, Gallo RC. Perspective on Kaposi's sarcoma: facts, concepts, and conjectures. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(17):1453-1458.
78. Alonso K, Pontiggia P, Medenica R, Rizzo S. Cytokine patterns in adults with AIDS. *Immunol Invest* 1997;26(3):341-350.
79. Barillari G, Gendelman R, Gallo RC, Ensoli B. The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1, a growth factor for AIDS Kaposi sarcoma and cytokine-activated vascular cells, induces adhesion of the same cell types by using integrin receptors recognizing the RGD amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(17):7941-7945.
80. Ensoli B, Buonaguro L, Barillari G, Fiorelli V, Gendelman R, Morgan RA, Wingfield P, Gallo RC. Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J Virol* 1993;67(1):277-287.
81. Ensoli B, Barillari G, Salahuddin SZ, Gallo RC, Wong-Staal F. Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature* 1990;345(6270):84-86.
82. Albini A, Soldi R, Giunciuglio D, Giraudo E, Benelli R, Primo L, Noonan D, Salio M, Camussi G, Rockl W, Bussolino F. The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat Med* 1996;2(12):1371-1375.
83. Harrington W Jr, Sieczkowski L, Sosa C, Chan-a-Sue S, Cai JP, Cabral L, Wood C. Activation of HHV-8 by HIV-1 tat. *Lancet* 1997;349(9054):774-775.
84. Aoki Y, Tosato G. Neoplastic conditions in the context of HIV-1 infection. *Curr HIV Res* 2004;2(4):343-349.
85. Pantanowitz L, Dezube BJ. Advances in the pathobiology and treatment of Kaposi sarcoma. *Curr Opin Oncol* 2004;16(5):443-449.
86. Simonart T. Iron: a target for the management of Kaposi's sarcoma? *BMC Cancer* 2004;4:1.
87. Ensoli B, Sturzl M, Monini P. Reactivation and role of HHV-8 in Kaposi's sarcoma initiation. *Adv Cancer Res* 2001;81:161-200.
88. Weninger W, Partanen TA, Breiteneder-Geleff S, Mayer C, Kowalski H, Mildner M, Pammer J, Sturzl M, Kerjaschki D, Alitalo K, Tschachler E. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 and podoplanin suggests a lymphatic endothelial cell origin of Kaposi's sarcoma tumor cells. *Lab Invest* 1999;79(2):243-251.
89. Gessain A, Duprez R. Spindle cells and their role in Kaposi's sarcoma. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(12):2457-2465.
90. Wang HW, Trotter MW, Lagos D, Bourboulia D, Henderson S, Makinen T, Elliman S, Flanagan AM, Alitalo K, Boshoff C. Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma. *Nat Genet* 2004;36(7):687-693.
91. Hong YK, Foreman K, Shin JW, Hirakawa S, Curry CL, Sage DR, Libermann T, Dezube BJ, Fingerth JD, Detmar M. Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Genet* 2004;36(7):683-685.
92. Carroll PA, Brazeau E, Lagunoff M. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of blood endothelial cells induces lymphatic differentiation. *Virology* 2004;328(1):7-18.
93. Matondo P, Zumla A. The spectrum of African Kaposi's sarcoma: is it consequential upon diverse immunological responses? *Scand J Infect Dis* 1996;28(3):225-230.

94. Von Roenn JH. Clinical presentations and standard therapy of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2003;17(3):747-762.
95. Rosai J. Skin: Tumors and tumorlike conditions. In: Rosai J, ed. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. 9th ed. Volume 1. Edinburgh: Mosby; 2004. p. 130-245.
96. O'Hara CD, Nascimento AG. Endothelial lesions of soft tissues: a review of reactive and neoplastic entities with emphasis on low-grade malignant ("borderline") vascular tumors. *Adv Anat Pathol* 2003;10(2):69-87.
97. Fisher C. Soft tissue tumors. Chapter 5. In: LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A, eds. *Pathology and genetics of skin tumors*, Lyon: IARC Press; 2006. p. 229-262.
98. Requena L, Sanguenza OP. Cutaneous vascular proliferations. Part III. Malignant neoplasms, other cutaneous neoplasms with significant vascular component, and disorders erroneously considered as vascular neoplasms. *J Am Acad Dermatol* 1998;38(2 Pt 1):143-175.
99. Lederman MM, Connick E, Landay A, Kuritzkes DR, Spritzler J, St Clair M, Kotzin BL, Fox L, Chiozzi MH, Leonard JM, Rousseau F, Wade M, Roe JD, Martinez A, Kessler H. Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and zalcitabine: results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315. *J Infect Dis* 1998;178(1):70-79.
100. Mitsuyasu RT. AIDS-related Kaposi's sarcoma: current treatment options, future trends. *Oncology (Williston Park)* 2000;14(6):867-878.
101. Schweitzer VG, Visscher D. Photodynamic therapy for treatment of AIDS-related oral Kaposi's sarcoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1990;102(6):639-649.
102. Lunardi-Iskandar Y, Bryant JL, Zeman RA, Lam VH, Samaniego F, Besnier JM, Hermans P, Thierry AR, Gill P, Gallo RC. Tumorigenesis and metastasis of neoplastic Kaposi's sarcoma cell line in immunodeficient mice blocked by a human pregnancy hormone. *Nature* 1995;375(6526):64-68.
103. Rainbow L, Platt GM, Simpson GR, Sarid R, Gao SJ, Stoiber H, Herrington CS, Moore PS, Schulz TF. The 222- to 234-kilodalton latent nuclear protein (LNA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) is encoded by orf73 and is a component of the latency-associated nuclear antigen. *J Virol* 1997;71(8):5915-5921.
104. Kellam P, Boshoff C, Whitby D, Matthews S, Weiss RA, Talbot SJ. Identification of a major latent nuclear antigen, LNA-1, in the human herpesvirus 8 genome. *J Hum Virol* 1997;1(1):19-29.
105. Kedes DH, Lagunoff M, Renne R, Ganem D. Identification of the gene encoding the major latency-associated nuclear antigen of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Clin Invest* 1997;100(10):2606-2610.
106. Kellam P, Bourboulia D, Dupin N, Shotton C, Fisher C, Talbot S, Boshoff C, Weiss RA. Characterization of monoclonal antibodies raised against the latent nuclear antigen of human herpesvirus 8. *J Virol* 1999;73(6):5149-5155.
107. Parravicini C, Chandran B, Corbellino M, Berti E, Paulli M, Moore PS, Chang Y. Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases: Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castlemans disease. *Am J Pathol* 2000;156(3):743-749.
108. Witmer AN, Dai J, Weich HA, Vrensen GF, Schlingemann RO. Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, and 3 in quiescent endothelia. *J Histochem Cytochem* 2002;50(6):767-777.
109. Zhang X, Wang JF, Chandran B, Persaud K, Pytowski B, Fingerhuth J, Groopman JE. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus activation of vascular endothelial growth factor receptor 3 alters endothelial function and enhances infection. *J Biol Chem* 2005;280(28):26216-26224.

110. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K. Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(8):3566-3570.
111. Jussila L, Valtola R, Partanen TA, Salven P, Heikkila P, Matikainen MT, Renkonen R, Kaipainen A, Detmar M, Tschachler E, Alitalo R, Alitalo K. Lymphatic endothelium and Kaposi's sarcoma spindle cells detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor-3. *Cancer Res* 1998;58(8):1599-1604.
112. Lymboussaki A, Partanen TA, Olofsson B, Thomas-Crusells J, Fletcher CD, de Waal RM, Kaipainen A, Alitalo K. Expression of the vascular endothelial growth factor C receptor VEGFR-3 in lymphatic endothelium of the skin and in vascular tumors. *Am J Pathol* 1998;153(2):395-403.
113. Ravindranath N, Wion D, Brachet P, Djakiew D. Epidermal growth factor modulates the expression of vascular endothelial growth factor in the human prostate. *J Androl* 2001;22(3):432-443.
114. Valtola R, Salven P, Heikkila P, Taipale J, Joensuu H, Rehn M, Pihlajaniemi T, Weich H, deWaal R, Alitalo K. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol* 1999;154(5):1381-1390.
115. Rosai J. Special techniques in surgical pathology. In: Rosai J, ed. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. 9th ed. Volume 1. Edinburgh: Mosby; 2004. p. 37-91.
116. Boshoff C, Schulz TF, Kennedy MM, Graham AK, Fisher C, Thomas A, McGee JO, Weiss RA, O'Leary JJ. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. *Nat Med* 1995;1(12):1274-1278.
117. Dittmer D, Lagunoff M, Renne R, Staskus K, Haase A, Ganem D. A cluster of latently expressed genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 1998;72(10):8309-8315.
118. Orenstein JM, Alkan S, Blauvelt A, Jeang KT, Weinstein MD, Ganem D, Herndier B. Visualization of human herpesvirus type 8 in Kaposi's sarcoma by light and transmission electron microscopy. *AIDS* 1997;11(5):F35-45.
119. Reed JA, Nador RG, Spaulding D, Tani Y, Cesarman E, Knowles DM. Demonstration of Kaposi's sarcoma-associated herpes virus cyclin D homolog in cutaneous Kaposi's sarcoma by colorimetric in situ hybridization using a catalyzed signal amplification system. *Blood* 1998;91(10):3825-3832.
120. Li JJ, Huang YQ, Cockerell CJ, Friedman-Kien AE. Localization of human herpes-like virus type 8 in vascular endothelial cells and perivascular spindle-shaped cells of Kaposi's sarcoma lesions by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1996;148(6):1741-1748.
121. Huang YQ, Li JJ, Zhang WG, Feiner D, Friedman-Kien AE. Transcription of human herpesvirus-like agent (HHV-8) in Kaposi's sarcoma. *J Clin Invest* 1996;97(12):2803-2806.
122. Sanders CJ, Canninga-van Dijk MR, Borleffs JC. Kaposi's sarcoma. *Lancet* 2004;364(9444):1549-1552.
123. Scadden DT. AIDS-related malignancies. *Annu Rev Med* 2003;54:285-303.
124. Ambroziak JA, Blackburn DJ, Herndier BG, Glogau RG, Gullett JH, McDonald AR, Lennette ET, Levy JA. Herpes-like sequences in HIV-infected and uninfected Kaposi's sarcoma patients. *Science* 1995;268(5210):582-583.
125. Huang YQ, Li JJ, Kaplan MH, Poiesz B, Katabira E, Zhang WC, Feiner D, Friedman-Kien AE. Human herpesvirus-like nucleic acid in various forms of Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995;345(8952):759-761.
126. Boshoff C, Whitby D, Hatzioannou T, Fisher C, van der Walt J, Hatzakis A, Weiss R, Schulz T. Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus in HIV-negative Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995;345(8956):1043-1044.

127. Chang Y, Ziegler J, Wabinga H, Katangole-Mbidde E, Boshoff C, Schulz T, Whitby D, Maddalena D, Jaffe HW, Weiss RA, Moore PS. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and Kaposi's sarcoma in Africa. Uganda Kaposi's Sarcoma Study Group. *Arch Intern Med* 1996;156(2):202-204.
128. Kennedy MM, Cooper K, Howells DD, Picton S, Biddolph S, Lucas SB, McGee JO, O'Leary JJ. Identification of HHV8 in early Kaposi's sarcoma: implications for Kaposi's sarcoma pathogenesis. *Mol Pathol* 1998;51(1):14-20.
129. Blauvelt A. Skin diseases associated with human herpesvirus 6, 7, and 8 infection. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2001;6(3):197-202.
130. Gao SJ, Kingsley L, Li M, Zheng W, Parravicini C, Ziegler J, Newton R, Rinaldo CR, Saah A, Phair J, Detels R, Chang Y, Moore PS. KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. *Nat Med* 1996;2(8):925-928.
131. Kedes DH, Operskalski E, Busch M, Kohn R, Flood J, Ganem D. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nat Med* 1996;2(8):918-924.
132. Simpson GR, Schulz TF, Whitby D, Cook PM, Boshoff C, Rainbow L, Howard MR, Gao SJ, Bohenzky RA, Simmonds P, Lee C, de Ruiter A, Hatzakis A, Tedder RS, Weller IV, Weiss RA, Moore PS. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* 1996;348(9035):1133-1138.
133. Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T. Expression and localization of human herpesvirus 8-encoded proteins in primary effusion lymphoma, Kaposi's sarcoma, and multicentric Castlemann's disease. *Virology* 2000;269(2):335-344.
134. Brenner B, Weissmann-Brenner A, Rakowsky E, Weltfriend S, Fenig E, Friedman-Birnbaum R, Sulkes A, Linn S. Classical Kaposi sarcoma: prognostic factor analysis of 248 patients. *Cancer* 2002;95(9):1982-1987.
135. Frances C. Kaposi's sarcoma after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13(11):2768-2773.
136. Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med* 2003;348(17):1681-1691.
137. Eceder ST, Sever MS, Yildiz A, Turkmen A, Kayacan SM, Kilicaslan I, Kocak T, Eldegez U. Kaposi's sarcoma after renal transplantation in Turkey. *Clin Transplant* 1998;12(5):472-475.
138. Huang JY, Chiang YJ, Lai PC, Shih LY, Huang CC, Chu SH, Wu CH. Posttransplant Kaposi's sarcoma: report from a single center. *Transplant Proc* 2004;36(7):2145-2147.
139. Cattani P, Capuano M, Graffeo R, Ricci R, Cerimele F, Cerimele D, Nanni G, Fadda G. Kaposi's sarcoma associated with previous human herpesvirus 8 infection in kidney transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2001;39(2):506-508.
140. Pak F, Pyakural P, Kokhaei P, Kaaya E, Pourfathollah AA, Selivanova G, Biberfeld P. HHV-8/KSHV during the development of Kaposi's sarcoma: evaluation by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Cutan Pathol* 2005;32(1):21-27.
141. Pantanowitz L, Pinkus GS, Dezube BJ, Tahan SR. HHV8 is not limited to Kaposi's sarcoma. *Mod Pathol* 2005;18(8):1148.
142. Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T. High expression of HHV-8-encoded ORF73 protein in spindle-shaped cells of Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol* 1999;155(1):47-52.
143. McDonagh DP, Liu J, Gaffey MJ, Layfield LJ, Azumi N, Traweek ST. Detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequence in angiosarcoma. *Am J Pathol* 1996;149(4):1363-1368.

144. Karpati S, Desaknai S, Desaknai M, Biro J, Nagy K, Horvath A. Human herpesvirus type 8-positive facial angiosarcoma developing at the site of botulinum toxin injection for blepharospasm. *Br J Dermatol* 2000;143(3):660-662.
145. Remick SC, Patnaik M, Ziran NM, Liegmann KR, Dong J, Dowlati A, Yao Y, Abdul-Karim FW, Giam CZ. Human herpesvirus-8-associated disseminated angiosarcoma in an HIV-seronegative woman: report of a case and limited case-control virologic study in vascular tumors. *Am J Med* 2000;108(8):660-664.
146. Lasota J, Miettinen M. Absence of Kaposi's sarcoma-associated virus (human herpesvirus-8) sequences in angiosarcoma. *Virchows Arch* 1999;434(1):51-56.
147. Ishak KG, Bijwaard KE, Makhoul HR, Taubenberger JK, Lichy JH, Goodman ZD. Absence of human herpesvirus 8 DNA sequences in vascular tumors of the liver. *Liver* 1998;18(2):124-127.
148. Schmid H, Zietz C. Human herpesvirus 8 and angiosarcoma: analysis of 40 cases and review of the literature. *Pathology* 2005;37(4):284-287.
149. Koizumi H, Ohkawara A, Itakura O, Kikuta H. Herpesvirus-like DNA sequences in classic Kaposi's sarcoma and angiosarcoma in Japan. *Br J Dermatol* 1996;135(6):1009-1010.
150. Gyulai R, Kemeny L, Kiss M, Adam E, Nagy F, Dobozy A. Herpesvirus-like DNA sequence in angiosarcoma in a patient without HIV infection. *N Engl J Med* 1996;334(8):540-541.
151. Fukunaga M. Kaposi's sarcoma-like pyogenic granuloma. *Histopathology* 2000;37(2):192-193.
152. Ryan P, Aarons S, Murray D, Markham T, O'Sullivan S, Lyons F, Lee G, Fitzgibbon J. Human herpesvirus 8 (HHV-8) detected in two patients with Kaposi's sarcoma-like pyogenic granuloma. *J Clin Pathol* 2002;55(8):619-622.
153. Urquhart JL, Uzieblo A, Kohler S. Detection of HHV-8 in pyogenic granuloma-like Kaposi sarcoma. *Am J Dermatopathol* 2006;28(4):317-321.
154. Cathomas G, McGandy CE, Terracciano LM, Itin PH, De Rosa G, Gudat F. Detection of herpesvirus-like DNA by nested PCR on archival skin biopsy specimens of various forms of Kaposi sarcoma. *J Clin Pathol* 1996;49(8):631-633.
155. Jin YT, Tsai ST, Yan JJ, Hsiao JH, Lee YY, Su IJ. Detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequence in vascular lesions. A reliable diagnostic marker for Kaposi's sarcoma. *Am J Clin Pathol* 1996;105(3):360-363.
156. Dictor M, Rambech E, Way D, Witte M, Bendsoe N. Human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) DNA in Kaposi's sarcoma lesions, AIDS Kaposi's sarcoma cell lines, endothelial Kaposi's sarcoma simulators, and the skin of immunosuppressed patients. *Am J Pathol* 1996;148(6):2009-2016.
157. Lebbe C, Pellet C, Flageul B, Sastre X, Avril MF, Bonvalet D, Morel P, Calvo F. Sequences of human herpesvirus 8 are not detected in various non-Kaposi sarcoma vascular lesions. *Arch Dermatol* 1997;133(7):919-920.
158. Hisaoka M, Hashimoto H, Iwamasa T. Diagnostic implication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus with special reference to the distinction between spindle cell hemangioendothelioma and Kaposi's sarcoma. *Arch Pathol Lab Med* 1998;122(1):72-76.
159. Schommer M, Herbst RA, Brodersen JP, Kiehl P, Katenkamp D, Kapp A, Weiss J. Retiform hemangioendothelioma: another tumor associated with human herpesvirus type 8? *J Am Acad Dermatol* 2000;42(2 Pt 1):290-292.
160. Herman PS, Shogreen MR, White WL. The evaluation of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) in cutaneous lesions of Kaposi's sarcoma: a study of formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Am J Dermatopathol* 1998;20(1):7-11.

161. Li N, Anderson WK, Bhawan J. Further confirmation of the association of human herpesvirus 8 with Kaposi's sarcoma. *J Cutan Pathol* 1998;25(8):413-419.
162. Cathomas G, Stalder A, McGandy CE, Mihatsch MJ. Distribution of human herpesvirus 8 DNA in tumorous and nontumorous tissue of patients with acquired immunodeficiency syndrome with and without Kaposi's sarcoma. *Mod Pathol* 1998;11(5):415-420.
163. Dupin N, Grandadam M, Calvez V, Gorin I, Aubin JT, Havard S, Lamy F, Leibowitch M, Huraux JM, Escande JP, et al. Herpesvirus-like DNA sequences in patients with Mediterranean Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995;345(8952):761-762.
164. Hammock L, Reisenauer A, Wang W, Cohen C, Birdsong G, Folpe AL. Latency-associated nuclear antigen expression and human herpesvirus-8 polymerase chain reaction in the evaluation of Kaposi sarcoma and other vascular tumors in HIV-positive patients. *Mod Pathol* 2005;18(4):463-468.
165. Blasig C, Zietz C, Haar B, Neipel F, Esser S, Brockmeyer NH, Tschachler E, Colombini S, Ensoli B, Sturzl M. Monocytes in Kaposi's sarcoma lesions are productively infected by human herpesvirus 8. *J Virol* 1997;71(10):7963-7968.
166. Bezold G, Messer G, Peter R, Flaig M, Sander C. Quantitation of human herpes virus 8 DNA in paraffin-embedded biopsies of HIV-associated and classical Kaposi's sarcoma by PCR. *J Cutan Pathol* 2001;28(3):127-130.
167. Folpe AL, Veikkola T, Valtola R, Weiss SW. Vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3): a marker of vascular tumors with presumed lymphatic differentiation, including Kaposi's sarcoma, kaposiform and Dabska-type hemangioendotheliomas, and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol* 2000;13(2):180-185.
168. Beckstead JH, Wood GS, Fletcher V. Evidence for the origin of Kaposi's sarcoma from lymphatic endothelium. *Am J Pathol* 1985;119(2):294-300.
169. Corbeil J, Evans LA, Vasak E, Cooper DA, Penny R. Culture and properties of cells derived from Kaposi sarcoma. *J Immunol* 1991;146(9):2972-2976.
170. Roth WK, Werner S, Risau W, Remberger K, Hofschneider PH. Cultured, AIDS-related Kaposi's sarcoma cells express endothelial cell markers and are weakly malignant in vitro. *Int J Cancer* 1988;42(5):767-773.
171. Roth WK, Brandstetter H, Sturzl M. Cellular and molecular features of HIV-associated Kaposi's sarcoma. *AIDS* 1992;6(9):895-913.
172. Russell Jones R, Orchard G, Zelger B, Wilson Jones E. Immunostaining for CD31 and CD34 in Kaposi sarcoma. *J Clin Pathol* 1995;48(11):1011-1016.
173. Rutgers JL, Wieczorek R, Bonetti F, Kaplan KL, Posnett DN, Friedman-Kien AE, Knowles DM 2nd. The expression of endothelial cell surface antigens by AIDS-associated Kaposi's sarcoma. Evidence for a vascular endothelial cell origin. *Am J Pathol* 1986;122(3):493-499.
174. Salahuddin SZ, Nakamura S, Biberfeld P, Kaplan MH, Markham PD, Larsson L, Gallo RC. Angiogenic properties of Kaposi's sarcoma-derived cells after long-term culture in vitro. *Science* 1988;242(4877):430-433.
175. Moses AV, Fish KN, Ruhl R, Smith PP, Strussenberg JG, Zhu L, Chandran B, Nelson JA. Long-term infection and transformation of dermal microvascular endothelial cells by human herpesvirus 8. *J Virol* 1999;73(8):6892-6902.
176. Ensoli B, Nakamura S, Salahuddin SZ, Biberfeld P, Larsson L, Beaver B, Wong-Staal F, Gallo RC. AIDS-Kaposi's sarcoma-derived cells express cytokines with autocrine and paracrine growth effects. *Science* 1989;243(4888):223-226.

177. Flore O, Rafii S, Ely S, O'Leary JJ, Hyjek EM, Cesarman E. Transformation of primary human endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nature* 1998;394(6693):588-592.
178. Samaniego F, Markham PD, Gendelman R, Watanabe Y, Kao V, Kowalski K, Sonnabend JA, Pintus A, Gallo RC, Ensoli B. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor present in Kaposi's sarcoma (KS) are induced by inflammatory cytokines and synergize to promote vascular permeability and KS lesion development. *Am J Pathol* 1998;152(6):1433-1443.
179. Skobe M, Brown LF, Tognazzi K, Ganju RK, Dezube BJ, Alitalo K, Detmar M. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) and its receptors KDR and flt-4 are expressed in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *J Invest Dermatol* 1999;113(6):1047-1053.
180. Pyakurel P, Pak F, Mwakigonja AR, Kaaya E, Heiden T, Biberfeld P. Lymphatic and vascular origin of Kaposi's sarcoma spindle cells during tumor development. *Int J Cancer* 2006;119(6):1262-1267.
181. Partanen TA, Alitalo K, Miettinen M. Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer* 1999;86(11):2406-2412.