



**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ONKOLOJİ BİLİM DALI**

HODGKİN LENFOMADA PRAME EKSPRESYONU VE KLİNİK ÖNEMİ

Uzm. Dr. Vehbi ERÇOLAK

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Semra PAYDAŞ

ADANA-2013



**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ONKOLOJİ BİLİM DALI**

HODGKİN LENFOMADA PRAME EKSPRESYONU VE KLİNİK ÖNEMİ

Uzm. Dr. Vehbi ERÇOLAK

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Semra PAYDAŞ

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu Tarafından
TF2012LTP2 no'lu proje ve ayrıca Tıbbi Onkoloji Derneği tarafından
desteklenmiştir**

ADANA-2013

TEŞEKKÜR

Tezin planlanma aşamasından başlamak üzere, son cümlesini yazana kadar bana katlanan, her sorumu sabırla cevaplayan ve bu tezin oluşmasında desteklerini esirgemeyen tez danışmanım **Prof. Dr. Semra PAYDAŞ**'a, yan dal uzmanlığım boyunca beni destekleyen, bilgi ve birikimlerini paylaşan Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı Hocalarım **Prof. Dr. Melek ERKİŞİ** ve **Prof. Dr. Berksoy ŞAHİN**'e, hocalığı kadar ağabeyliğini de unutmayacağım **Doç. Dr. İ.Oğuz KARA**'ya, beraber çalıştığım uzman ve asistan arkadaşlarıma, Onkoloji Bilim Dalının tüm hemşire, personel, sekreter ve bana özellikle yardımlerını esirgemeyen Kanser Kayıt Birimi Hemşiresi **Pınar KUM**'a, hasta desteği için **Prof. Dr. İlhan TUNCER**'e, benden ve PRAME'den sıkıldıklarını tahmin ettiğim fakat bana her zaman kibar ve sabırlı davranan Patoloji Anabilim Dalından **Prof. Dr. Melek ERGİN** ve **Yrd. Doç. Dr. Emine BAĞIR**'a, **Şakir UÇAR**, **Sinan ÖZBULAT** ve özellikle her telefonumda karşımda olan ve benimle beraber tezi sahiplenilen **Kezban BOSTANER**'e, PCR çalışmaları için fikirlerini bizle paylaşan **Kahraman TANRIVERDİ**'ye ve Nano Gen Teknolojileri'nin değerli çalışanlarına, istatistiksel analizlerim için kapısını çaldığımızda bizden tebessüm ve yardımlarını esirgemeyen **Doç. Dr. Gülşah ŞEYDAOĞLU**'na, tüm istatik sorularımı cevaplayıp yanımda olan **Evren ASLANER**'e....

Esasen üniversiteye bile gitmeyi düşünmezken, hatta aklımda doktorluk bile yokken arkamda devamlı itici güç olan, bana benden daha çok inanan, benimle gurur duyup, her zaman dik durmamı sağlayan o arkamdaki güce; aileme ve özellikle daha paylaşacak çok şey varken aramızdan ayrılan rahmetli babama, PRAME'i benim sayemde tanıyan ama uzmanı olan, tezin her kelimesinde desteğini veren, tüm cefalı, ayrılıklarla, özlemle dolu doktorluk hayatımın her saniyesinde sonsuz desteğini hep hissettiren sevgili eşime ve her an “senden ayrı kalmaya değer mi” sorusunu bana sorduran ve kendisiyle yeterince ilgilenemediğimi düşündüğüm ve af dilediğim tatlı kızıma...

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNUYORUM...

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLolar LİSTESİ.....	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
KISALTMALAR LİSTESİ	VI
ÖZET ve ANAHTAR KELİMELER	IX
ABSTRACT and KEY WORDS	X
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Hodgkin Lenfoma Tanım ve Subtipleri	4
2.3. Hodgkin Lenfoma Risk Faktörleri	5
2.3.1. Çevre ve Yaşam Tarzı.....	5
2.3.2. Epstein-Barr Virus Enfeksiyonu	6
2.3.3. Immunosupresyon	7
2.3.4. Otoimmün Hastalık	7
2.3.5. Genetik	7
2.3.6. Diğer Nedenler	8
2.4. Hodgkin Lenfoma Histopatolojisi.....	8
2.4.1. Noduler Sklerozan Histopatolojisi	9
2.4.2. Miks Sellüler Hodgkin Lenfoma Histopatolojisi	9
2.4.3. Lenfosit Zengin Histopatolojisi.....	10
2.4.4. Lenfosit Fakir Histopatolojisi	10
2.4.5. Noduler Lenfosit Predominant Histopatolojisi	10
2.5. Hodgkin Lenfomada Immüfenotip.....	11
2.6. Hodgkin Lenfomada Sinyal Yolakları	15
2.7. Hodgkin Lenfomada Klinik	17
2.8. Hodgkin Lenfomada Laboratuvar	21
2.9. Hodgkin Lenfomada Tanı	22
2.10. Hodgkin Lenfomada Ayırıcı Tanı	23
2.11. Hodgkin Lenfomada Evreleme	25

2.12. Hodgkin Lenfomada Prognoz	29
2.12.1. Hodgkin Lenfomada İleri Evrede Prognostik Faktörler	29
2.12.2. Hodgkin Lenfomada Erken Evrede Prognostik Faktörler.....	31
2.13. Hodgkin Lenfomada Tedavi	33
2.13.1. Erken Evre Olumlu Prognostik Faktörlü Hastaların Tedavisi (IA, IIA). 33	
2.13.2. Erken Evre Olumsuz Prognostik Faktörlü Hastaların Tedavisi (IA, IIA) 34	
2.13.3. İleri Evre Hastaların Tedavisi	35
2.13.4. Relaps Refrakter Hastalık Tedavisi.....	36
2.13.5. Nodüler Lenfosit Predominant Hodgkin Lenfoma Tedavisi.....	38
2.14. Tümör İlişkili Antijenler	39
2.15. PRAME Tanımı ve Görülme Sıklığı.....	41
2.16. PRAME Fonksiyonu	43
2.17. PRAME Gen Regülasyonu	47
2.18. Hemopoetik Malignansilerde PRAME Sıklığı ve Takipte Önemi.....	47
2.19. Hemopoetik Neoplazilerde PRAME Ekspresyonunun Prognostik Önemi	51
2.20. Solid Tümörlerde PRAME ve Ekspresyonunun Prognostik Önemi	51
2.21. PRAME Hedeflenerek Yapılan İmmunoterapi	54
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	56
3.1. İHK Yöntemle PRAME Çalışma Yöntemi	58
3.2. İmmunhistokimyasal Yöntemle PRAME'in Değerlendirilmesi	59
3.3. RT-PCR Yöntemiyle PRAME Çalışma Yöntemi	61
3.3.1. Formalin Fixed Parafin Embedded (FFPE) Dokudan RNA İzolasyonu...	61
3.3.2. Primerlerin Hazırlanması	63
3.3.3. Pure Total RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi	63
3.3.4. PRAME ve ACTB Gen Ekspresyonlarının Real-Time PCR ile Belirlenmesi.....	64
3.4. İstatistiksel Metod	65
5. BULGULAR.....	67
5. TARTIŞMA	87
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	100
KAYNAKLAR	102
ÖZGEÇMİŞ	127

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo No:

Sayfa No:

Tablo 1. HL Histolojik Alt Tipleri (WHO* sınıflaması).....	4
Tablo 2. Reed Stenberg Hücrelerinin İmmünojenotipik Özellikleri	12
Tablo 3. HL’da Klinik ve Histopatolojik Bulguların Sitokin Salınımı İle İlişkisi ¹³⁵	14
Tablo 4. NLP HL ile Klasik HL’in Morfolojik ve İmmünojenotipik Özellikleri	15
Tablo 5. HL İçin Ann Arbor Evrelendirmesi Cotswolds Modifikasyonu	28
Tablo 6.* İleri Evre HL Hastalarda IPI’a Göre 5 Yıllık HSK, GSK (1998)	30
Tablo 7.* İleri Evre HL Hastalarda IPI’a Göre 5 Yıllık HSK, GSK (2012)	30
Tablo 8. Farklı Çalışma Gruplarına Göre Erken Evre HL’da Olumsuz Prognostik Faktörler	32
Tablo 9. HL İçin Uluslararası Prognostik İndekse Göre Kötü Risk Faktörleri	56
Tablo 10. Demografik, Klinik, Laboratuvar Verileri (n:110)	68
Tablo 11. Klinik Verileri (n:110)	69
Tablo 12. İHK ve RT-PCR ile PRAME Bakılan Olgularla İlgili Sonuçlar.....	71
Tablo 13. Hastalısız Sağakalım Verileri (n:110)	72
Tablo 14. Genel Sağakalım Verileri (n:110)	74
Tablo 15. İHK ile PRAME Çalışılan 82 Olguda Demografik ve Klinik Veriler	76
Tablo 16. RT-PCR ile PRAME Çalışılan 82 Olguda Demografik ve Klinik Veriler	77
Tablo 17. PRAME İHK ve RT-PCR Verileri İle Hasta Özelliklerinin Karşılaştırılması	78
Tablo 18. PRAME Çalışılan Olgularda Hastalısız Sağakalım Verileri.....	80
Tablo 19. PRAME Çalışılan Olgularda Genel Sağakalım Verileri	85
Tablo 20. Toplam ve Hastalısız Sağakalımı Etkileyen Bağımsız Faktörlerin Saptanmasında Kullanılan Çoklu Regresyon (Cox Regresyon) Analiz Sonuçları	86

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1. Reed-Sternberglerde PRAME boyanması negatif (-) (İHKx40).....	59
Şekil 2. Reed-Sternberglerde PRAME boyanması (sitoplazmik +) (İHKx40).....	60
Şekil 3. Reed-Sternberglerde PRAME boyanması (sitoplazmik ++) (İHKx40)	60
Şekil 4. Histiyoitlerde sitoplazmik Preme boyanması (+) (İHKx40).....	61
Şekil 5. Preme (RT-PCR) ekspresyonuna göre hastalıksız sağkalım eğrileri	81
Şekil 6. Preme (IHK) ekspresyonuna göre hastalıksız sağkalım eğrileri.....	82
Şekil 7. Preme (RT-PCR) ekspresyonuna göre genel sağkalım eğrileri	83
Şekil 8. Preme (IHK) ekspresyonuna göre genel sağkalım eğrileri.....	84

KISALTMALAR LİSTESİ

HL	: Hodgkin Lenfoma
PRAME	: Preferentially expressed antigen of melanoma
AML	: Akut Myelositik Lösemi
RAR	: Retinoik Asit Reseptörü
MRH	: Minimal Rezidül Hastalık
NHL	: Non Hodgkin Lenfoma
IPS	: International Prognostic Score
HSK	: Hastalıksız Sağkalım
GSK	: Genel Sağkalım
RT-PCR	: Real-Time Polymerase Chain Reaction
RS	: Reed Stenberg
NS	: Noduler Sklerozan
MS	: Miks Sellüler
LZ	: Lenfosit Zengin
LF	: Lenfosit Fakir
NLP	: Noduler Lenfosit Predominat
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
EBV	: Epstein Barr Virus
CMV	: Sitomegalo Virus
HTLV	: Human T-Lymphotropic Viruses
LMP1-2A	: Latent Membran Proteini
EBNA	: Epstein Barr Nükeer Antijen 1
HIV	: Human immun deficiency virüs, insan immun yetmezlik virüsü
HLA	: Human Lokosit Antijeni
L&H	: Lenfosit Histoyosit
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
Ig	: Immunglobulin
PAX5	: Paired-box transcription factor
EBF	: Early B-cell factor
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör

TGF-β	: Transforming growth faktör β
DBBHL	: Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma
EBERs	: Epstein Barr Virus encoded small RNAs
RTKs	: Reseptör tirozin kinazlar
PI3K	: Fosfo İnozitol 3 kinaz
MAPK/ERK	: Mitojen-Aktiveli Protein Kinaz Ekstrasellüler Sinyal-Regülasyonlu Kinaz yolağı
STAT	: Signal transducers and activators of transcription
AP-1	: Activator protein-1
IP3K/AKT	: Fosfo İnozitol 3 kinaz /Aurora Kinase Thymoma
RANK	: Receptor Activator of Nuclear Factor κ B
TRAF	: TNF receptor-associated factor
JAK	: Janus Kinase
LAP	: Lenf adenopati
ITP	: İmmün Trombositopenik Purpura
ESH	: Eritrosit Sedimentasyon Hızı
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
EMA	: Epitelial Membran Antijen
ALK	: Anaplastik Lenfoma Kinaz
PMBHL	: Primer Mediastinal B Hücreli Lenfoma
TH2BHL	: T Hücreden Zengin Büyük B hücreli Lenfoma
ABHL	: Anaplastik Büyük Hücreli Lenfoma
LCA	: Leukocyte Common Antigen
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
MR	: Manyetik Rezonans
USG	: Ultrasonografi
PET-BT	: Pozitron Emisyon Tomografisi- Bilgisayarlı Tomografi
ABVD	: Adriamisin, bleomisin, vinblastin, dakarbazin
EORTC	: The European Organization for the Research and Treatment of Cancer
GHSG	: The German Hodgkin's Study Group
KT	: Kemoterapi
RT	: Radyoterapi

MOPP	: Nitrogen mustard, vinkristin, prokarbazin, prednizon
NCCN	: The National Comprehensive Cancer Network
BEACOPP	: Bleomisin-Etoposide-Doksorubicin-Siklofosfamid-Vincristin-Prokarbazin- Prednizon
MOPP-EBV-CAD:	Meklorethamin, vinkristin, prokarbazin, prednison, epidoksorubisin, bleomisin, vinblastin, lomustin, doksorubisin, and vindesin ()
COPP	: Siklofosfamid- Vinkristin-Prokarbazin-Prednizon
YDKT	: Yüksek Doz Kemoterapi
PKHN	: Periferik Kök Hücre Nakli
TİA	: Tümör İlişkili Antijen
KTA	: Kanser Testis Antijen
MHC	: Major histocompatibility complex
STL	: Sitotoksik T Lenfosit
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
ALL	: Akut Lenfositik Lösemi
HDAI	: Histon Deasetilaz İnhibitörleri
TRAIL	: TNF related apotozis –inducing ligand
HCL	: Saçlı Hücreli Lösemi
KML	: Kronik Myelositik Lösemi
RCC	: Renal Hücreli Kanser
ER	: Estrogen Reseptörü
ICE	: Ifosfamid-Carboplatin-Etoposid
DHAP	: Deksametazon-Sitozin Arabinozid-Sisplatin
ESHAP	: Etoposid-SitozinArabinozid-Sisplatin-Salumedrol
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik Asit
PBS	: Phosphate buffer saline

ÖZET

Hodgkin Lenfomada PRAME Ekspresyonu ve Klinik Önemi

Giriş ve Amaç: Kemoterapiye rezistan Hodgkin Lenfomalı olgularda yeni tedavi stratejileri gelişmesi için yeni hedeflerin tanımlanması gerekmektedir. PRAME (Preferentially expressed antigen of melanoma), otolog sitotoksik T lenfositler tarafından tanındığının belirlenmesinden beri tümör immunoterapisi için umut verici bir aday olmuştur. Testis, over, endometrium ve adrenaller hariç normal dokularda eksprese edilmez veya zayıf eksprese edilen PRAME birçok solid tümörde ve hematolojik malignansilerde yüksek seviyelerde eksprese edilir. Hodgkin Lenfomada PRAME ekspresyon ile ilgili bilgi çok azdır. Bu çalışmanın amacı Hodgkin Lenfomada PRAME ekspresyonunu araştırmak, Hodgkin Lenfomda bilinen prognostik faktörlerle ilişkisini anlamak ve immunoterapi için PRAME'in hedef molekül olarak kullanılabilirliğinin saptamaktır. Ayrıca Real-Time Polymerase Chain Reaction ile Immunhistokimya yöntemleri kullanılarak bu iki yöntemi kıyaslamak amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, Hodgkin Lenfoma tanısı almış olgulardan klinik takibe ulaşılabilen ve örneklerine ulaşılabilen 110 hasta alınmıştır. Hastaların demografik, klinik, laboratuvar ve prognostik değerleri retrospektif olarak kaydedildi. Bu 110 olgudan Patoloji ulaşılabilen toplam 82 hastanın dokularında Immunhistokimya ve Real-Time Polymerase Chain Reaction yöntemleri ile PRAME çalışıldı. Veriler uygun istatistiksel yöntemlerle test edildi.

Bulgular: Immunhistokimyasal olarak 15 (% 18.3) hastada, Real-Time Polymerase Chain Reaction ile 8 (% 9.8) hastada PRAME saptandı. PRAME ekspresyonu saptanan olgularda International Prognostic Score 4 ve üzerinde olması PRAME pozitif olgularda anlamlı şekilde fazla bulundu ($p:0.039$). Real-Time Polymerase Chain Reaction ile PRAME çalışılan 82 hastada Hastalıksız Sağkalım ve Genel Sağkalım analizinde yaşam süresi PRAME pozitif olgularda, belirgin kısa idi ($p:0.0005$). Immunhistokimya ile PRAME analizinde de benzer şekilde Hastalıksız Sağkalım ve Genel Sağkalım daha kısaydı fakat istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı. 45 yaş üstünde olmak, ileri evre hastalık, yüksek risk grubunda olması, yüksek International Prognostic Score olması ve 12 aydan daha kısa sürede relaps olması durumunda Hastalıksız Sağkalım daha kısaydı. Toplam ve hastalıksız sağkalımı etkileyen bağımsız faktörlere bakıldığında sadece ileri yaş ve yüksek risk grubunun sağkalımı etkileyen bağımsız faktörler olduğu görüldü. PRAME pozitifliği ölüm riskini arttırsa da (3.56) istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Sonuç: PRAME saptanmasında Real-Time Polymerase Chain Reaction daha duyarlı bir yöntem olarak saptanmıştır. PRAME analizi için Immunhistokimya da kullanılabilir bir yöntemdir. Özellikle Histiyositler ve Reed Stenberg hücrelerinde PRAME ekspresyonunun gösterilmesi ileriki çalışmalar için yol gösterici olabilir. Bu sonuçlar PRAME ekspresyonunun Hodgkin Lenfomada kötü prognostik parametre olabileceğini işaret etmektedir.

Anahtar Sözcükler: PRAME, Hodgkin Lenfoma, Prognoz, Hastalıksız Sağkalım, Genel Sağkalım, RT-PCR, Immunhistokimya.

ABSTRACT

PRAME Expression in Hodgkin's Lymphoma and its Clinical Significance

Introduction and Aim: It is necessary to define new targets in order to develop new treatment strategies in cases with chemo-resistant Hodgkin Lymphoma. PRAME (Preferentially expressed antigen of melanoma) has become a promising candidate for tumour immunotherapy since it was detected that it is recognized by the autologous cytotoxic T lymphocytes. PRAME is not expressed or mildly expressed in normal tissues except for the testicle, ovary, endometrium and adrenals while it is expressed in high levels in many solid tumours and hematologic malignancies. There is little information on the PRAME expression in Hodgkin Lymphoma. The purpose of this study was to examine PRAME expression in Hodgkin Lymphoma, to understand its relation with the known prognostic factors, and to detect the usability of PRAME as target molecule for immunotherapy in Hodgkin Lymphoma. In addition, the aim was to compare the Real-Time Polymerase Chain Reaction and Immunohistochemistry methods by using those two methods.

Materials and methods: The study covered 110 patients who were diagnosed with Hodgkin Lymphoma and whose samples and clinical follow-ups could be accessed. Demographic, clinic, laboratory and prognostic values of the patients were recorded retrospectively. Out of 110 cases, biopsy samples could be accessed for a total of 82 patients. PRAME was studied in the tissue samples of those patients through Immunohistochemistry and Real-Time Polymerase Chain Reaction methods. Data was tested by using appropriate statistical methods.

Results: PRAME was detected in 15 (18.3%) patients with Immunohistochemistry and in 8 (9.8%) patients with Real-Time Polymerase Chain Reaction. International Prognostic Score was 4 and above in the cases that were detected with PRAME expression, and this figure was found to be significantly significant in PRAME positive cases ($p: 0.039$). Disease-Free Survival and Overall Survival was analysed for the 82 patients for whom PRAME was studied. Overall Survival was found to be shorter in cases with PRAME positive as compared with PRAME negative with Real-Time Polymerase Chain Reaction, ($p: 0.0005$). Similarly Disease-Free Survival and Overall Survival were found to be shorter in PRAME positive cases by using Immunohistochemistry but this did not reach a statistical significance. Disease-Free Survival was shorter depending on being over the age of 45, in the advanced phase of disease, in the high-risk group, having high International Prognostic Score and relapsing before 12 months. When the independent factors affecting Overall Survival and Disease-Free Survival were considered, it was seen that only advanced age and high-risk group were the independent factors affecting survival. Although being PRAME positive increases the mortality risk (or: 3.56) this was not found statistically significant.

Conclusion: It was found that Real-Time Polymerase Chain Reaction was found to be more sensitive method in detecting PRAME expression. Immunohistochemistry is also a useful method for PRAME analysis. Particularly showing the PRAME expression

in Histiocytes and Reed Stenberg cells can be a guide for future studies. These results indicate that PRAME expression can be an adverse prognostic parameters in Hodgkin Lymphoma.

Key Words: PRAME, Hodgkin Lymphoma, Prognoses, Disease-Free Survival, Overall Survival, RT-PCR, Immunohistochemistry.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hodgkin Lenfomada (HL) prognoz, kombinasyon tedavileri içeren kemoterapötiklerle önemli oranda gelişmesine rağmen kemoterapiye rezistan hastalıkta tedavi seçenekleri sınırlıdır. Kemoterapiye rezistan HL'lı olgularda yeni tedavi stratejileri gelişmesi için yeni hedeflerin tanımlanması gerekmektedir. İdeal hedef, tümör hücrelerinde ekprese edilirken normal dokularda ekprese edilmemesidir. Bu yüzden yeni hedeflerin tanımlanması, kemoterapiye rezistansta rol alan faktörlerin belirlenmesine ve relaps riskinin arttığı hastaların önceden belirlenmesinde faydalı olabilir.¹ Bu perspektifte bakıldığında PRAME (Preferentially expressed antigen of melanoma), otolog sitotoksik T lenfositler tarafından tanındığının belirlenmesinden beri tümör immunoterapisi için umut verici bir aday olmuştur.²

PRAME ilk kez melanomada yüzey antijenine karşı otolog sitotoksik T hücreleri ile tanınan tümör ilişkili antijen olarak tanımlanmıştır.³ PRAME kodlayan gen 22.kromozonda bulunur ve 509 aminoasitlik bir proteini kodlar.^{4,5} Testis, over, endometrium ve adrenaller hariç normal dokularda ekprese edilmez veya zayıf ekprese edilir. Melanoma dışında küçük hücreli dışı akciğer kanseri, baş-boyun yassı hücreli karsinomlar, sarkomlar, renal karsinom, meme karsinomu, nöroblastoma ve medullablastoma gibi solid tümörlerde, lösemi, myelom ve lenfoma gibi hematolojik malignansilerde yüksek seviyelerde ekprese edilir.^{2,6} PRAME kanser testis antijeni denilen MAGE, GAGE/PAGE, BAGE, NY-ESO-1, Sperm protein 17 denilen ailenin bir üyesidir ve bunların aksine lösemilerde özellikle de Akut Myelositik Lösemi'de (AML) ekprese edilir.⁷ Sıklık olarak değerlendirildiğinde PRAME; melanomda % 88, metastazlarında % 95, baş-boyun karsinomlarında % 39, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde % 46-78, renal hücreli kanserde % 41, sarkomlarda % 39, meme kanserlerinde % 27, akut lösemide % 33 ekprese olduğu gösterilmiştir.

PRAME, retinoik asit (RA) tarafından uyarılan diferansiyasyon, büyümenin durması ve apoptozisi bloke ederek etkisini gösterir.^{2,8} Retinoik asit reseptör (RAR) sinyalinin dominant baskılayıcısı olduğu saptanmıştır.^{8,9} Lösemik hücrelerde apoptozis ile ilişkili proteinlerle ilgili gen ekspresyonunda azalmayla lösemik hücrelerin yaşam süresinin uzaması ve miyeloid farklılaşmasında inhibisyon bildirilmiştir.^{10,11} Bunların tersine lösemik hücrelerde PRAME'in in- vivo tümör gelişimini azalttığı ve lösemik

hücre serilerinde kaspaz bağımsız hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir.^{10,12} Lösemide, bu çelişkili durumun tersine solid tümörlerde yüksek PRAME genellikle seviyeleri kötü klinik sonuçlarla ilişkilidir.¹³ Özellikle meme kanseri ve ileri evre Noroblastomada PRAME ekspresyonu ile kötü klinik gidiş arasında ilişki saptanmıştır.¹⁰ Ayrıca kemoterapi (KT) alan hastalarda PRAME ekspresyonunun azalması sonucunda özellikle pediyatrik olgularda minimal rezidüel hastalığın (MRH) monitorizasyonunda da kullanılabilir.^{10,2} Özellikle lösemilerde Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ile kantitatif değerlendirme de MRH saptanması için iyi bir belirleyicidir.⁵

PRAME bir tümör antijeni olarak birçok tümörde eksprese olduğu gösterilmiş olmakla beraber HL'da PRAME ekspresyon ile ilgili bilgi çok azdır. Martin S. Staeger ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada PRAME'in yalnızca rezistan HL'lı olgulara ait hücre serilerinde eksprese olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada tümör antijenlerinin ekspresyonu, kemo-rezistan HL'da ko-stimülatör moleküller ile HL hücrelerine karşı sitotoksik T hücre cevabı için hedef olabileceği de belirtilmiştir.^{1,13} Klaus Willenbrock ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HL'lı hastalar, anaplastik büyük hücre lenfomalar ve B hücreli Non Hodgkin Lenfoma'larla (NHL) karşılaştırıldığında PRAME ekspresyonu HL'da çok yüksek bulunmuştur.¹⁴

Bu çalışmanın amacı HL'da PRAME ekspresyonunu araştırmak, HL'da bilinen prognostik faktörlerle (sedimentasyon, lokosit, lenfosit, hemoglobin, albumin, beta 2 mikroglobulin, nodal alan sayısı ve lokalizasyonu, bulky hastalık, mediastinal kitle boyutu, ektranodal hastalık durumu, International Prognostic Score (IPS), yanıt durumu ve B semptomu varlığı, kemoresistansla ve/veya tedaviye yanıt ile ilişkisini, hastalıksız sağkalım (HSK), genel sağkalıma (GSK) etkisini saptamaktır. Ayrıca PRAME ekspresyonunun prognostik öneminin yanı sıra çeşitli hemopoetik neoplazilerde immunoterapi için bir hedef olduğu bilgisinden yola çıkılarak özellikle HL'da PRAME'in immun tedavide bir hedef molekül olarak kullanılabilirliğinin saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla HL'lı hasta örneklerinde hem Immunhistokimyasal (IHK) olarak hem de Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ile PRAME ekspresyonu değerlendirilmiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, 1-2'si hariç, PRAME, RT-PCR yöntemi ile ve taze dokularda incelenmiştir. Bu çalışmada parafinli dokudan RT-PCR ile PRAME ekspresyonu çalışılmış ve aynı

örneklerden IHK ile PRAME çalışılmıştır. Buradaki amaç; parafinli dokuların PRAME analizinde RT-PCR yöntemi için kullanılabilir olup olmadığının saptanması ve görece az görülen ve uzun süreli yaşama potansiyeli olan HL olgularının PRAME analizi için retrospektif olarak değerlendirilebilirliğini saptamaktır. Çalışma grubunda PRAME analizi için ayrıca IHK yöntemi de uygulanmıştır. Buradaki amaç da RT-PCR ile IHK yöntemlerinin kıyaslanabilir olup olmadığının saptanması ve eğer kıyaslanabilir bulunur ise IHK gibi pek çok merkezde uygulanabilirliği olan IHK ile PRAME analizinin çok sayıda örnekte, retrospektif örneklerde de güvenilir olarak kullanılıp kullanılamayacağını saptamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hodgkin Lenfoma Tanım ve Subtipleri

HL ilk olarak 1831’de Thomas Hodgkin tarafından tanımlanmıştır. B lenfositlerinden köken alır. Lenf nodlarının ilerleyici bir şekilde büyümesi ve büyümenin komşu lenf nodlarına sıçraması ile karakterize olarak tanımlanmıştır.¹⁵ HL, germinal merkez ve postgerminal merkez B hücrelerinden gelişen, inflamatuvar bir zeminde Reed-Sternberg (RS) ve varyantları gibi neoplastik hücrelerin bir kısmını içeren hücre kompozisyonuna sahip, değişik klinikopatolojik özellikler ile B hücreli lenfomalardan ayrılan heterojen bir tümör grubudur. Neoplastik hücrelerin morfolojisi, inflamatuvar zemindeki hücre kompozisyonunun farklılığına bağlı ve tümör hücrelerinin immunfenotipik görünümüne dayanılarak 2 büyük subgruba ayrılır (tablo 1). Klasik HL grubunda hücreler germinal merkezli B hücrelerinden köken almıştır fakat normal germinal merkezli B hücrelerinin tanımlanmış gen ve gen ürünlerinin çoğunu eksprese etmede yetersizdir. Tümör hücrelerinin görünümü ve reaktif arka plandaki hücre kompozisyonuna göre Noduler Sklerozan (NS), Miks Sellüler (MS), Lenfositten Zengin (LZ), Lenfositten Fakir (LF) olmak üzere 4 gruba ayrılır. İkinci subgrup ise tümör hücrelerinin germinal merkez B hücrelerinin immunfenotipik özelliklerinin korunduğu Noduler Lenfosit Predominant (NLP) HL’dir. Klasik HL’a göre daha sessiz bir hastalıktır.¹⁶

Tablo 1. HL Histolojik Alt Tipleri (WHO* sınıflaması)

•	Nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfoma (NLP HL)
•	Klasik Hodgkin lenfoma
✓	Nodüler Sklerozis (NS HL)
✓	Karışık Hücreli (MC HL)
✓	Lenfositten Zengin (LZ HL)
✓	Lenfositten Fakir (LF HL)

***WHO: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)**

2.2. Hodgkin Lenfoma Epidemiyolojisi

Tüm lenfomaların % 10, dünyada yıllık tüm kanser vakalarının % 0,6’dır.¹⁷ ABD yıllık 9060 yeni vaka, 1190 HL bağlı ölüm bildirilmiştir.¹⁸ Avrupa’da ise insidansı

100.000 kişide 2,4'dür.¹⁹ NLP HL, başlangıç tanılı hastaların % 5'dir.¹⁶ İnsidansı her yıl için 10 milyonda 8-9'dur.²⁰⁻²¹ % 75 erkek hakimiyeti vardır.²⁰

HL endüstrileşmiş ülkelerde adolesan ve genç erişkinlerde daha sık görülürken gelişmekte olan ülkelere çocuklarda daha sık görülmektedir.²² Bimodal yaş dağılımı gösterir. Yaş spesifik insidansı coğrafik lokalizasyon ve endüstriyel gelişim seviyesine paralellik gösterir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve ekonomik olarak gelişmiş ülkelere genç adultlerde (20'li yaşlar) ve yaşlı hastalarda iki ayrı pik vardır.²³ Hafifçe erkek üstünlüğü vardır ve hastaların çoğu genç adultlerdir. Ekonomik olarak gelişmemiş bölgelerde erkekler için çocukluk çağında ilk pik vardır, genç adultlerde görece olarak düşüktür ve yaşlılarda geç bir pik olur.²⁴ NLP HL'da biri çocukluk, biri adultlerde iki pik vardır. Median yaş 30-40 ile biraz daha geçtir.²⁵ Klasik HL aksine beyazlarla karşılaştırıldığında Afrikan Amerikanlarda daha yaygındır.²⁰

Baskın olan histolojik tipleri de coğrafik lokalizasyon ve ekonomik gelişmişliğe göre ayrılır. ABD gibi gelişmiş ülkelere NS tip baskındır ve piklerin çoğu genç adultlerde görülür. Ekonomik olarak ileri olmayan ülkelere MS tip baskındır, çocuklar ve yaşlılarda daha sıktır. Erken sanayileşmiş veya geçiş ekonomilerinde MS ve NS subtiplerinin frekansı eşittir.^{24,26,27} ABD ve Avrupa Ülkelerinde Klasik HL NS tipi % 70, MS tipi % 20-25, LZ tipi % 5 ve LF tipi % 1'den az bulunmaktadır.²⁸

2.3. Hodgkin Lenfoma Risk Faktörleri

2.3.1. Çevre ve Yaşam Tarzı

HL'nin çocukluk formu ailedeki kişi sayısı arttıkça ve sosyoekonomik durum azaldıkça artmaya eğilimlidir.²⁹ Erişkindeki formu ise tam tersine ekonomik olarak ileri ülkelere genç adultlerde HL gelişmesinin risk faktörleri erken çocukluk döneminde yüksek standartlarla yaşamı belirten faktörlerle (anne eğitimi yüksek olanlarda ve kardeş sayısı az olanlarda) ilişkili görünmektedir. Özellikle bu ilişki NS HL için spesifik olarak görülmektedir.^{30,31} MS HL'da ise sosyoekonomik durumla olan bu ilişki tersinedir.³² Ekonomik olarak avantajlı bu popülasyonda daha düşük sosyoekonomik gruplar arasında MS HL ve LF HL subgruplarının baskınlığını görmekteyiz ve bu gruplarda Epstein Barr Virus (EBV) pozitifliği daha sıktır.³³ HL riski ile sosyoekonomik durumlar arasındaki ilişkiyle ilgili bilgiler genellikle yaygın olan çevresel ve enfeksiyöz etiyolojik ajanlara gecikmiş maruziyet ile ilişkilidir.³⁴⁻³⁸ Erken

dönemde yuva ve bakım evlerine verilen çocukların genç erişkinlik döneminde HL gelişim riski azalmıştır. Bu risk azalması, çocukluk çağında enfeksiyöz ajanlara erken maruz kalmanın sonucunda hücrel immünite olgunlaşması ile açıklanmıştır.³⁹ EBV'ün neden olduğu Enfeksiyöz Mononukleoz hikayesi olan hastalarda HL riski artmışken,⁴⁰⁻⁴³ diğer çocukluk çağı enfeksiyonlarda (Suçiçeği, kızamık, kızamıkçık, kabakulak, boğmaca) negatif bir ilişki vardır.⁴² Ek olarak Sitomegalo Virus (CMV), Human Herpes Virüs 6-7-8, Polyoma JC Virüs, Adeno Virüs tip 5 ve 12, Human T Lymphotropic Viruses (HTLV) 1-2 ve Human Retrovirüs 5'in HL'lı tümör hücrelerinde mevcudiyetinin kanıtı yoktur.³⁴⁻⁴⁴

2.3.2. Epstein-Barr Virus Enfeksiyonu

HL biyopsi materyallerinin % 25-50'sinde, RS hücrelerinde, EBV DNA ve gen ürünleri pozitif bulunmuştur, bu da HL ve EBV arasındaki ilişkinin bir göstergesi olarak kabul görmüştür.⁴⁵ Yapılan başka bir çalışmada HL insidansındaki artışın özellikle çocukluk çağı ve 55-74 yaş arası dönemindeki EBV ile ilişkili olduğu, 15-34 yaş arası genç erişkinlik dönemindeki EBV ile ilgili olmadığı bildirilmiştir.⁴⁶ EBV ile ilişkili vakalarda virus RS hücrelerine ve variantlarına lokalizedir. EBV gen ürünlerini kodlayarak üretmiştir ve bu gen ürünleri Latent Membran Protein 1 (LMP1), Latent Membran Protein 2A (LMP2A) ve Epstein Barr Nükleer Antijen 1 (EBNA1) olarak tespit edilmiş ve bu üretim patterni EBV enfeksiyonunun latent tip 2 şekli ile ilişkilidir.⁴⁷ EBV LMP 1 üretimi klasik HL histolojik alt tipleri arasında değişkenlik gösterir. Human Immunodeficiency Virus (HIV) ile bağlantılı LF HL'da % 10, MS HL'da % 75, LZ tipinde % 45-45 ve NS tipinde % 10-40 ilişkili bulunmuştur.⁴⁸ EBV pozitif HL olgularında histolojik alt tipte erkek cinsiyetin daha baskın olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmaya göre, çocukluk çağı HL olguları sıklıkla ekonomik olarak daha az gelişmiş bölgelerde yaşayan bireylerde görülmektedir. Ekonomik açıdan gelişmekte olan ülkelerde yaşayan bireyler arasında, HL'lı çocuklarda EBV pozitiflik oranı 6 kat daha fazla bulunmuş ve erken yaşta enfeksiyon ajanı ile karşılaşmanın risk artışına yol açtığı savunulmuştur.⁴⁹ Glaser ve ark. 15 uluslararası çalışmanın verilerini bir arada değerlendirmişler ve analiz sonucunda hastaların % 40'ında tümör spesmeninde EBV genomunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada yapılan çok değişkenli analiz sonuçları, EBV pozitifliğinin çocukluk çağında ve orta yaş grubunda daha sık olduğunu

göstermektedir. HIV pozitif HL'larda EBV pozitifliği % 100'dür ve bu oran NHL için düşüktür. Ailesel HL olgularının EBV ile ilişkili olma olasılığı ise daha düşüktür.⁵⁰

2.3.3. Immunosupresyon

HL, solid organ veya hemopoetik hücre transplantasyonu, otoimmün hastalığa bağlı immunsupresif alanlar, HIV enfeksiyonlarında artmıştır.⁵¹⁻⁵⁵ HIV ile enfekte olanlarda HL riski 5-25 kat artmıştır.⁵⁶⁻⁶⁰ HIV pozitif bireylerde HL –özellikle alt tipleri- daha yüksektir.⁶¹ HIV pozitif HL olgularında CD20 ve Bcl-6/syn-1 sıklıkla pozitifdir.⁶² İmmunsupresiflerde HL riskinin artması, NHL'lardan daha çarpıcıdır ve gelişme zamanları da farklıdır.^{52,54} Örneğin; HL Hemopoetik hücre veya solid organ transplantasyonundan sonra 4 yıl ve üzerinde gelişirken, NHL ilk yıllarda daha yaygındır. Ayrıca NHL belirgin immunsupresyon ilişkili iken CD 4 sayısı normal veya normale yakın hastalarda HL gelişebilir. Tüm lenfomaların % 2'sinden sorumlu olduğu düşünülen renal transplant alıcılarında HL sıklığı NHL ile karşılaştırıldığında daha düşüktür. Organ transplant alıcılarında beklenen HL oranı % 0,2'dir. Post-transplant HL olgularının hemen hemen tümü EBV pozitif olgulardır. Genelde tanı anında ileri evrede olup kötü bir prognoza sahiptir.⁶³

2.3.4. Otoimmün Hastalık

Otoimmün hastalığı olanlarda, HL gelişme riski artmıştır.⁶⁴ İsveç ve Danimarka'dan yapılan çalışmalarda Otoimmün hastalıkla ilgili kişisel öykü ve aile öyküsüyle HL arasında ilişki gösterilmiştir.⁶⁵ Örneğin romatoid artritli hastalarda HL için rölatif risk 2-5 kat arasında artış göstermektedir.⁶⁶ Bir diğer çalışmada ise sağlıklı bireylere oranla inflamatuvar barsak hastalığı olgularında HL riskinin 8,6 kat arttığı ortaya konmuştur.⁶⁷ Ayrıca tüberküloz olgularında da HL riskinin arttığını gösteren çalışmalar vardır.⁶⁸ Diyabet hastalarında ise HL riski azalmış olarak bulunmuştur.⁶⁹

2.3.5. Genetik

Genetik yatkınlık ve aile üyelerinde aynı yaygın çevresel maruziyete bağlı olarak HL gelişme riski HL'lı hastaların yakınlarında en yüksektir. Bu risk beklenenin 3-4 katı kadardır.⁷⁰⁻⁷² ve bu risk artışı daha çok genç kardeşler ve erkekler arasında gözlenirken, yaşlı adultlerde gözlenmez.⁷³ Tek yumurta ikizlerinde bu risk yaklaşık 100

kat artmıştır.⁷⁴ HL riski ile bazı Human Lokasit Antijen (HLA) haplotipleri arasında, özellikle HLA A-1 ve daha az oranda HLA B-5, HLA B-8, HLA B-18 arasında vardır ve bu bireylerde HL sıklığının 1,3-1,7 kat arttığı gösterilmiştir.⁷⁵ Aynı çalışmada HLADPB1*0301 olan bireylerde HL görülme riski yüksek iken, HLA-DPB1*0401 olan Japon bireylerde risk daha düşük bulunmuştur.⁷⁵⁻⁸¹ Hastalığın etiolojisinde genetik faktörlerin etkili olabileceğinin bir diğer kanıtı ise Yahudiler arasında HL sıklığının diğer popülasyonlara göre daha yüksek olmasıdır.⁸² HL ile genetik faktörler arasında bir ilişki olduğunu düşündürmesine rağmen, bugüne kadar HL için spesifik bir gen tanımlanmış değildir. Ancak yüksek riskli HL ailelerinin tarandığı bir çalışmada 4.kromozomun kısa kolunda D4S394 belirleyicisi ile güçlü bir bağlantı olduğu, ayrıca 2.ve 11. kromozomlar ile zayıf bir bağlantı olduğu gösterilmiştir. Bulgular resesif geçişli bir kalıtım olasılığını düşündürmektedir.⁸³

2.3.6. Diğer Nedenler

Emzirmenin koruyucu etkileri birçok çalışma ile gösterilmiştir fakat bunun anneden geçen antikörlara bağlı olduğu bilinmemektedir.^{84,85} Aspirinin de HL gelişimine karşı koruyucu olabileceği, sigaranın ise riski arttırdığı saptanmıştır.⁸⁶⁻⁸⁸ Bazı gözlemsel araştırmalar ağaç, herbisid ve diğer kimyasal madde sektörlerinde çalışan işçilerde HL görülme olasılığının artmış olduğundan bahsetmektedir.^{89,90} Tonsillektomi yapılan bireylerde HL riskinin arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur.⁹¹ Obesitenin de HL riskini arttırabildiği gösterilmiştir.⁹²

2.4. Hodgkin Lenfoma Histopatolojisi

Klasik HL; küçük lenfosit, eozonofil, nötrofil, makrofaj plazma hücresi, fibroblast ve kollagen fibrilleri gibi çeşitli hücrelerin oluşturduğu inflamatuvar bir zeminde tanısal RS hücrelerinin mevcudiyeti ile karakterizedir. Reaktif hücrelerin çeşitli tiplerinin mevcudiyeti, özellikle infiltratif makrofajların ve eozonofillerin sayısı prognostik değere sahip olabilir. Tanısal RS hücreleri hafifçe bazofilik sitoplazmalı, çift loblu, çift veya multipl çekirdekli, belirgin eozonifilik ve inklüzyon benzeri çekirdekçiği olan geniş hücrelerdir.²⁸ Nükleoluslar karakteristik olarak makronükleolus görünümünde olup, büyüklükleri komşu lenfositlere eşittir. İlaveten bu neoplastik hücrelerin varyantları da olabilir. Bunlar laküner hücre, mumya hücre ve Lenfosit &

Histoyosit (L&H) hücre (popcorn hücre) olarak adlandırılırlar.⁹³ Hodgkin hücresi terimi mononükleer varyantlar için kullanılabilir. Mumyalanmış Hücre, piknotik kırmızımsı çekirdekli ve yoğunlaşmış sitoplazma içeren neoplastik hücrelerdir. Laküner hücre, multiloblu çekirdek, küçük çekirdekçik, bol açık renk sitoplazmalı, doku fiksasyonu veya kesiminde sıklıkla retrakte olan, çekirdeği bırakarak boş yer olarak görünen hücrelerdir. L&H varyantları veya diğer adıyla ‘popcorn hücreleri’ veziküler, polilobule çekirdekli, küçük, genellikle periferik çekirdekçikli olan perinükleer halosu olmayan hücrelerdir.

Patogenezinde germinal merkezlerdeki B-hücrelerinden köken alan RS hücreleri mutasyonlar sonucu B-hücre reseptör afinite kapasitesini kaybetmiş, klonal seleksiyona karşı koyarak, apoptozisden (programlı hücre ölümünden) kaçmayı başarmıştır. Apoptozdan bu kaçışta, sinyal aktivasyonu yolundaki faz aracılı apoptoz inhibitörü (FLIP) reseptörünün artması ve transkripsiyon faktörlerinden Nükleer Faktör Kappa (NF-κB) seviyesinde artma sorumlu tutulmaktadır.^{94,95}

2.4.1. Nodüler Sklerozan Histopatolojisi

NS HL fibröz bantlar ile nodüllere ayrılmış, nodüler büyüme paterni gösteren, nekroz alanları olabilen, prognostik RS hücrelerinin nadir olduğu, tipik neoplastik hücrenin laküner hücre olduğu ve bunların nodülün merkezi içinde agrage olduğu HL tipidir. İnflamatuar zemin genellikle eozonifiller, histiosit ve nötrofiller içerir. Bazı histolojik varyantları tanımlanmıştır. Fibröz bantların az gelişmiş veya göze çarpmamış olabildiği NS HL’nın sellüler fazı denen görünüm.^{6,97} ve sınırsız NS HL denilen laküner hücrelerin geniş agregatlar veya yaprak gibi bulunduğu ve tipik NS HL ile benzer prognoz gösteren varyantı vardır.⁹⁸ Bir veya daha fazla sklerotik band varlığı tanımlayıcıdır. Bantlar matür aselüler kollagenlerden oluşmaktadır. LZ HL alt tip folliküler varyantı ile sıklıkla karıştırılabilir. Laküner hücreler NS HL için oldukça karakteristiktir. Klasik HL olgularında gözlenen CD15 veya CD30 pozitifliği, daha az sıklıkta gözlenmektedir.

2.4.2. Miks Sellüler Hodgkin Lenfoma Histopatolojisi

MS HL band oluşturan sklerozisin eşlik etmediği, nodüler büyüme veya diffüz büyüme paterni gösteren HL subtipidir. İnce fibrozis olabilir, diagnostik RS hücreleri

kolayca tespit edilir, zemindeki infiltrasyon değişken olmakla beraber tipik olarak Eozonofil, Notrofil, Histiosit ve Plazma hücreleri içerir.⁹⁶

2.4.3. Lenfositten Zengin Histopatolojisi

LZ HL'da nodüler büyüme paterni en yaygındır fakat diffüz de olabilir. Tanısal RS hücreleri olabilir fakat aynı zamanda mononükleer Hodgkin Hücreleri ve bazen L&H Hücrelerine benzeyen hücre olabilir. İnfiltrasyon zemininde lenfositler baskındır, eozonofil veya nötrofiller nadirdir veya yoktur. Bazı vakalar nodüler büyüme paternine sahiptir, regrese olmuş germinal merkez belirtileri içerir, mantle zon ve interfolliküler bölgelerde hem varyant hem de klasik RS hücreleri vardır.⁹⁹ Bu antite Folliküler HL veya nodüler lenfositten zengin klasik HL olarak adlandırılır.¹⁰⁰

2.4.4. Lenfositten Fakir Histopatolojisi

LF HL diffüz büyüme paterni gösterir ve sıklıkla fibrozis ve nekroza bağlı hiposellüler görünür, inflamatuvar hücreler azdır, çok sayıda RS hücresi ve varyantları mevcuttur. LF HL, fibrotik ve retiküler/sarkomatöz olarak iki farklı alt tipte değerlendirilebilir. NS HL'nın aksine LF HL olgularında ince fibröz bantlar izlenmemektedir. Lenf nodunda gözlenen fibrozis hücre nodülleri etrafında değil, daha çok tek bir hücrenin etrafında yer almaktadır. RS hücrelerinin birleşen tabakaları olabilir buna retiküler varyasyon veya Hodgkin Sarkom olarak adlandırılır.^{96,101} Bu varyant Anaplastik Büyük Hücreli Lenfomadan ayırt etmek zor olabilir.^{102,103}

2.4.5. Noduler Lenfosit Predominant Histopatolojisi

NLP HL neoplastik hücreler genellikle lenfohistiyositler veya L&H RS hücre varyantlarıdır Bunlar germinal merkez B hücrelidir. Bu hücreler Ig gen yeniden düzenlenmesini üretirler ve Ig genlerinin devam eden somatik hipermutasyonlarının kanıtını gösterirler.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷ Neoplastik L&H varyantları, CD4(+)/CD57(+) T hücre olağan dışı popülasyonunda ve folliküler dendritik hücreden zengin olan genişlemiş B hücre follikülleri içinde tipik olarak bulunur. Hem NLP HL hem klasik HL germinal merkez B hücre orjinlidir. NLP HL hücrelerin survi ve büyümesi, genişlemiş B hücre folikülünün çevresi içinde Ig reseptörü vasıtasıyla üretilen sinyale bağlı normal germinal merkezli B hücrelerinkine benzer.¹⁰⁸ L&H hücrelerinin kemokin ve sitokin

kaynakları zengin olmadığından sistemik semptomlar klasik HL'a göre tipik olarak yoktur. NLP HL tersine klasik HL'da RS hücrelerinin büyümesi Ig reseptör sinyalinden bağımsızdır ve bunun yerine alternatif resptörlere (CD30 ve NF-Kb transkripsiyon faktör aktivatörü olan CD40) bağlıdır.¹⁰⁹ Klasik HL'da RS hücreleri hem lokal hem de sistemik etkileri olan inflamatuvar sitokin ve kemokin üretirler. Histolojik incelemede kapsül genellikle intakttır. Nadir olarak fibrozis görülebilmekle birlikte, hastalık sıklıkla nodüler bir yayılım paterni göstermektedir. Diffüz varyant ise oldukça nadirdir. NLPHL olgularında neoplastik hücreleri L&H hücreleri genellikle nodüllerin çevresinde yerleşme eğilimindedirler. L&H hücreleri görünüm olarak sentroblastlara benzemektedirler.¹¹⁰

2.5. Hodgkin Lenfomada Immunfenotip

Neoplastik hücrelerin immunfenotipi, hem klasik HL'ı NLP HL'dan hem de diğer lenfomalardan ayırmada anahtar rol oynar. Germinal merkez ve postgerminal merkez B hücrelerinden köken alan RS hücreleri folliküler lenfoma veya diğer malignansilerden elde edilen normal germinal merkezli B hücrede bulunan transkripsiyon faktörlerini sentezlemezler.¹¹¹ Klasik HL'da RS hücreleri klasik olarak CD 15 (% 85) ve CD 30 (yaklaşık % 89) eksprese ederler B hücre belirteçlerini(CD 19,20,79a) ve T hücre belirteçlerini (CD 3, 7) eksprese etmezler.¹¹² Bununla birlikte klasik HL vakaların çoğu RS hücrelerine oranla B hücre antijeni ekspresyonuna (CD 79a'dan daha sık CD 20) sahiptir.^{113,114} HL'nın klasik tipleri arasında CD 20 ekspresyonu LZ HL'da en yüksektir.^{99,100,112,115} CD20 pozitifliği, özellikle EBV negatif olan klasik HL olgularının %30-40'ında bulunmaktadır. Bu olgularda CD79a pozitifliği daha düşük sıklıkta izlenmektedir.^{116,117} CD 4 gibi tek bir T hücre antijen ekspresyonu RS hücrelerinde arada sırada görülebilir fakat multiple T hücre antijen eksprese etmesi çok nadirdir. CD 15 ve CD 30'a ilaveten, RS hücreleri CD25, HLA-DR, ICAM-1, CD95 (apo-1/fas), TRAF1 ve hem CD40 hem de CD86 birlikte eksprese ederler.^{113,114,118-121}

RS hücreleri çok sayıda antijen içermektedir. Bu antijenler CD30, CD15, CD70, TARC, IRF4 (MUM1) gibi bu antijenler genellikle normal T veya B hücrelerinde eksprese edilmeyen antijenlerdir. RS hücrelerinin immunofenotipik özellikleri Tablo 2'de gösterilmiştir. RS hücreleri, CD45 ve epitelyal membran antijeni (EMA)

ekspresyonu göstermemektedir. NLP HL olgularının aksine klasik HL olgularında *Bcl-6* ekspresyonu görülebilmektedir. İlave olarak klasik HL olguları genellikle PAX5 ve MUM1 ile pozitif; BOB1 ve Oct2 ile negatif boyanma özelliği göstermektedir. Fenotipik bulguların prognostik önemi olabilir. CD15 negatif HL olgularında relaps insidansının yüksek, sağkalım oranının ise düşük olması bunun en güzel örneğidir. CD15 negatifliği bağımsız bir prognostik faktör olarak değerlendirilmektedir. Benzer sonuçlar CD20 pozitif olgular için de elde edilmiştir.^{116,117}

Tablo 2. Reed Stenberg Hücrelerinin İmmunofenotipik Özellikleri

	CD45 (%)	CD15 (%)	CD30 (%)	CD20 (%)
Klasik HL	7	87	89	24
NLP HL	65	37	38	92
B hücreli lenfoma	97	4	18	94
T hücreli lenfoma	89	21	42	0

RS hücrelerinin klonal immungloblin (Ig) rearanjmanları içerdiği ve bu sebeple neoplazinin B hücre kökenli olduğu gösterilmiştir.¹²² RS hücrelerinin Ig ağır (% 87,5) ve hafif zincir (% 75) gen rearanjmanları taşıması da bunu destekler, ancak bu hücrelerin Ig transkripsiyonu hatalıdır. Ayrıca benzer Ig V gen rearanjmanlarının saptanması ile HL hücreleri için karakteristik bir özellik oluşturulmuştur.^{123,124} RS hücrelerinde Ig gen rearanjmanları gibi B hücre belirteçleri ve atipik T hücre, dendritik hücre belirteçlerinin ekspresyonları da tespit edilmiştir. B hücre belirteçlerinin ekspresyonunu regüle eden transkripsiyon faktörleri bilinmektedir. Bunlardan PAX5 (paired-box transcription factor), E2A ve EBF (early B-cell factor) en önemlileridir.^{125,126} RS hücrelerinin temel özelliği TNF(tümör nekrozis faktör) reseptör ailesine üye olan CD30 yüzey marker ekspresyonlarının yüksek olmasıdır. CD 30 reseptörlerinin CD 30 ligand veya antikorları ile etkileşimi sonucunda HL kökenli hücre dizilerinde hücre proliferasyonuna neden olduğu gösterilmiştir.¹²⁷⁻¹²⁸ Hücrelerin monosit ve granülosit markeri CD15, dendritik hücre markeri CD83 ve T hücre transkripsiyon faktörü olan Notch-1 eksprese ettikleri ve dendritik hücrelerden salınan Thymus and Activation-Related Chemokine (TARC) kemokinine sahip oldukları da gösterilmiştir.¹²⁹⁻¹³¹ RS hücreleri CD45, CD 20, CD19 gibi B hücre markerlerini ve B-hücre yüzey antijenlerini eksprese etmezler. Ayrıca, fonksiyonel B hücre reseptörü

taşımazlar ve Ig transkripsiyon faktörlerinin önemli bir kısmının ekspresyonu azalmıştır.^{132,133} BOB1, OCT2 ve PU 1 primer Hodgkin ve Reed/ Sternberg hücrelerinde eksikliği gösterilmiş immunoglobulin spesifik transkripsiyon faktörleridir.¹³⁴ HL neoplastik hücrelerin çeşitli sitokinler saldığı tespit edilmiş, bu salınımın özellikle hastalığın iki ana alt tipinde, belirgin bir histopatolojik görünüm ve klinik bulgularla ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (tablo 3). RS hücrelerinde CD30 ve CD40 ekspresyonundaki artış NF- κ B ve c-jun N-terminal kinaz yolunun aktivasyonu ve sonuç olarak da RS hücre proliferasyonu, adezyon moleküllerinin ekspresyonu, sitokin salınımı ile ilişkilendirilmiştir. Klasik HL'da eozinofili ve kollajen skleroz gibi histopatolojik bulgular IL-4, IL-5, eotaksin, IL-6, IL-7, IL-13, TNF, lenfotoksin, Transform Büyüme Faktörü Beta (TGF- β) ve basic fibroblast growth faktör salınımına bağlanmıştır. Sitokinler tarafından düzenlenen adezyon moleküllerinin de RS hücrelerine ve çevreleyen komşu T lenfositlere etki ederek hastalığın metastatik kapasitesini belirlediği düşünülmüştür. Sistemik semptomlar en fazla artmış IL-6 seviyesi ile ve tedavi almamış hastalardaki immunsüpresyon da en fazla TGF- β seviyesi ile korrelasyon göstermiştir.¹³⁵

NLP HL'da klasik HL tersine B hücre yüzey antijeni (CD 19(+), CD 20(+) CD 22(+), CD 79a(+)), germinal merkezli B hücre spesifik transkripsiyon faktörü (Bcl 6(+)) ve CD 45(+) eksprese ederler, CD 15 (-) ve CD 30 ekspresyonu nadirdir (tablo 4). NLP HL'nın tersine klasik HL'da RS hücresinde follikül merkez B hücre ilişkili nükleer Bcl-2 proteini yokluğu sıktır, plazma hücre ilişkili antijen CD 138 eksprese edebilir.^{136,137} EBV pozitif vakalarda tümör hücreleri EBV LMP-1 eksprese ederler fakat EBNA-2 eksprese etmezler. Ek olarak BSAP/PAX-5 (B hücre serisinin spesifik transkripsiyon faktörü) düşük düzeyde ekspresyonu vakaların çoğunda görülür ve T hücreli lenfoma ile klasik HL ayırımına yardım eder. B hücre spesifik transkripsiyon faktörü Pu-1, Oct-2, BOB-1 gibi immunoglobulin ekspresyonu sürücüler genellikle azalmış veya saptanmamıştır, oysa ki T hücrelerinden eksprese edilen bazı faktörler (Notch-1 gibi) artmıştır.¹¹¹ Oct-2 ve BOB-1'in değerlendirilmesi zor vakalarda Difüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DBBHL) veya klasik HL ile NLP HL ayırımında faydalı olabilir.^{138,139}

Klasik HL vakalarının çoğunda klonal sitogenetik anormallikler bulunur.^{140,141} Bu anormallikler vakadan vakaya farklıdır ve sıklıkla kromozomal değişkenlik gösteren intraklonal değişiklikler vardır. HL'da 2 grup klonal anormallik tespit edilmiştir.^{142,143}

Çoğu vaka B hücreli lenfomaya tipik olan 14q anormalliği gösterir, ancak t (14;18) nadiren görülür.

Klasik HL subtipleri arasında EBV tutulumu değişkendir. EBV enfeksiyonu immünohistokimyasal olarak LMP-1'in, insitu hibridizasyonla Epstein Barr Virus encoded small RNAs'in (EBERs) gösterilmesi ile saptanabilir. EBV'nin saptanması klasik HL ve EBV negatif olan diğer lenfomaların (özellikle Anaplastik Büyük Hücreli Lenfoma) ayırıcı tanısında yardımcı olmaktadır. EBV NS HL'da seyrek olarak bulunurken LZ HL'da yaklaşık % 40, MS HL'da % 70, LF HL'da % 100'e yakın bulunur. LF HL nadir bir subtiptir, immüyetmezlik durumları ile güçlü ilişkisi vardır. Bu subtepe, EBV enfeksiyonun yüksek insidansı katkıda bulunur. İmmüsupresyon ilişkili HL, aynı zamanda EBV ilişkili lenfoma ve genellikle LF veya MS HL subtiplidir.^{52,54,144,145-150} NLP HL patogeneğinde EBV yoktur.

Tablo 3. HL'da Klinik ve Histopatolojik Bulguların Sitokin Salınımı İle İlişkisi¹³⁵

Bulgular	Sitokinler
* B semptomları	TNF,LT-alfa,IL-1,IL-6
* Polikaryon oluşumu	INF-gama,IL-4
* Skleroz	TGF-β,LIF,PDGF,IL-1,TNF
* Akut faz reaksiyonu	IL-1,IL-6,IL-11,LIF
* Eozinofili	IL-5,GM-CSF,IL-2,IL-3
* Plazmasitöz	IL-6,IL-11
* Hafif trombositöz	IL-6,IL-11,LIF
* T hücre ve HRS hücre etkileşimi	IL-1,IL-2,IL-6,IL-7,IL-9,TNF,CD30L,CD40L,CD80,CD86,LT-alfa
* İmmün yetmezlik	TGF-β, IL-10
* Otokrin büyüme faktörleri	IL-6,IL-9,TNF,CD30L,M-CSF
* ALP de artış	M-CSF
* Nötrofil aktivasyonu ve birikim	IL-8,TNF,TGF-β

Tablo 4. NLP HL ile Klasik HL'nin Morfolojik ve İmmunfenotipik Özellikleri

	KLASİK HL	NLP HL
PATERN	Diffüz, interfolliküler,noduler	Noduler (en azından bir kısmında)
TÜMÖR HÜCRELERİ	Tanısal RS hücreleri, mononükleer veya laküner hücreler	'L&H' veya 'popcorn' Hücresi
İNFLAMATUAR ZEMİN	Lenfosit, histiyosit, euzonofil, plazma hücresi	Lenfosit, histiyosit
FİBRÖSİS	Yaygın	Nadir
CD 15	+	-
CD 30	+	-
CD 20	-/+	+
CD 45	-	+
EMA	-	+
EBV (RS hücrelerinde)	+(yaklaşık %50)	-
Oct-2	-/+	+
BOB 1	-/+	+
LENFOSİT ZEMİN	Thücre > B hücre	B hücre > T hücre
CD 57(+) T HÜCRELERİ	-	+

2.6. Hodgkin Lenfomada Sinyal Yolakları

RS hücrelerinde birden fazla sinyal yolağının aberan yolla aktivasyonunun olduğu ortaya konmuştur. Bu aberan sinyal molekül ve yolakları Notch- 1, Reseptör tirozin kinazlar (RTKs), Fosfo İnoзит 3 kinaz (PI3K) , Mitojen-Aktiveli Protein Kinaz Extrasellular Sinyal-Regülasyonlu Kinaz yolağı (MAPK/ERK) ve transkripsiyon faktörleri olan NF-κB, signal transducers and activators of transcription (STAT), Activator protein-1 (AP-1) olarak rapor edilmiştir.

Notch 1; transmembran reseptör ailesinin bir üyesidir, aktivasyonu sonucunda kök hücre ve T hücrelerin gelişiminin yanında, B hücre gelişiminde de transkripsiyon faktörü E2F aracılı olarak rol alır. Notch 1'in RS hücrelerinde aşırı ekspresyonu ve aşırı aktivasyonunun NF-κB üzerinden etkili olduğu rapor edilmiştir. Notch 1 yolağının ligandı olan Jagged 1'in aşırı ekspresyonu ile HRS tümör hücrelerinin proliferasyonunun ve hücrelerin apoptozise direncinin sağlandığı gösterilmiştir.¹⁵¹

RS hücrelerinde normal dışı aktivasyon gösteren 6 adet kinaz enzimi gösterilmiştir.¹⁵² Ayrıca normal germinal merkez B hücrelerinde de eksprese edilen reseptör tirozin kinaz c met'in de RS hücrelerinde ekspresyonu bilinmektedir.¹⁵³ İki önemli sinyal yolağı olan Fosfo İnoзит 3 kinaz /Aurora Kinase Thymoma (PI3K/AKT) ve MAPK/ERK'in RTKs reseptörlerinin de dahil olduğu integrin, sitokin ve G protein reseptörleri ile aktive olduğu ve bu yolakların da RS hücrelerinde aşırı aktivasyonunun

olduğu bilinmektedir. PI3K/AKT yolağının, sinyallerin regülasyonunu sağlayarak anti-apoptotik protein Bad fosforilasyonunda etkili olduğu, kaspaz-9 ve NF-κB aktivasyonunun inhibisyonu ile apoptozisi engellediği ve hücre siklusu inhibisyonunda rol aldığı bilinmektedir. Ancak RS hücrelerinde PI3K/AKT yolağının aşırı aktivasyonunun net sonucu tam olarak bilinmemektedir.^{154,155} MAPK/ERK yolağının aktivasyonunun ise çeşitli transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu ve aktivasyonunda önemli rol aldığını ve MEK inhibisyonu ile RS hücrelerinin sağkalım ve proliferasyonunda regülasyon sağlandığı gösterilmiştir.¹⁵⁶

NF-κB ise RS hücrelerinde aşırı aktivasyonu bilinen transkripsiyon faktörlerinden biridir.¹⁵⁷ NF-κB aktivasyonu sonucu immün cevabın oluşmasını sağlayan birçok proteinin ve anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonu sağlanır. RS hücrelerinde NF-κB 'nin aşırı aktivasyonu hücrelerin sağkalımı için esansiyeldir ve hem RS hücre dizilerinde hem de primer RS hücre analizlerinde gösterilmiştir.¹⁵⁸ NF-κB yolağının aktivasyonu çeşitli yollarla meydana gelir. CD30, CD40, Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (RANK) gibi çeşitli reseptörlerin TNF receptor-associated factor (TRAF) ile birleşerek NF-κB yolağını aktive ettiği bilinmektedir. RS hücrelerinde bu reseptörlerin ekspresyonu, hücrelerin çevresinde de reseptör ligandlarının aşırı ekspresyonu rapor edilmiştir.¹⁵⁸⁻¹⁵⁹ CD 30 reseptörlerinin NF-κB aktivasyonunu sağlamasının yanında RS hücrelerinde ligand bağımsız olarak aşırı ekspresyonu da sözkonusudur.¹⁶⁰ Bunların dışında HRS hücrelerinde NF-κB yolağının normal işleyişini bozan iki genetik değişiklik de tanımlanmıştır. Bunlar; -κB geni Rel onkogenindeki mutasyonlar¹⁶¹ ve IκBα , IκB β genlerindeki inaktif mutasyonlardır.¹⁶²⁻¹⁶⁴ NF-κB yolağında başka bir etken de EBV'dir. EBV ile enfekte hücrelerde eksprese edilen 3 viral proteinden (EBNA 1, LMP1 ve LMP2a) LMP 1 proteinin ekspresyonunun STAT 3 transkripsiyon faktörü ile ilişkili olduğu,^{165,166} CD40 aracılı aşırı NF-κB aktivasyonunu taklit ettiği ve böylece germinal merkezde B hücre sağkalımında ve farklılaşmasında major rol oynadığı gösterilmiştir.¹⁶⁷⁻¹⁶⁸ LMP1 sinyalizasyonu TRAF proteinlerinin LMP1'lerin sitoplazmik kısımlarına bağlanmasıyla başlar, NF-κB aktivasyonu ile son bulur.¹⁶⁹ LMP2 proteini ise B hücre reseptörlerinin ekspresyonunu inhibe eder ve hücredeki sinyal yollarının aktivasyonunu B hücre belirleyicileri olmaksızın devam ettirir.¹⁷⁰ LMP1 ve LMP2a proteinleri ayrıca T hücre ve foliküler dendritik hücreler çevresinde stimülatör sinyalleri taklit ederek NF-κB aktivasyonuna ve

antiapoptotik genlerin regülasyonunda artışa neden olurlar. Bu regülasyondaki artış ile RS hücrelerinin germinal merkezdeki seleksiyondan korunduğu düşünülmektedir.

STAT ailesi proteinlerinden birkaç tanesinin de RS hücrelerinde aşırı ekspresyonu görülmüştür.¹⁷¹ RS hücrelerinde aktivasyonu bilinen STAT proteinleri; STAT 3, STAT 5, ve STAT 6'dır.^{172,173} STAT 3 aktivasyonunun RS hücrelerinde hücre sağkalımı için major önemde olduğu tartışılmaktadır ve STAT 3 proteinlerinin HRS hücrelerinde sürekli aktivitesi rapor edilmiştir.^{172,174} Aşırı STAT 6 aktivasyonunun ise IL-13 ve IL-13 reseptör ekspresyonuna neden olurken, Janus Kinase (JAK) aracılı STAT 6 aktivasyonu RS hücre hatlarında hücre proliferasyonunu artırır. STAT 6 aktivasyonu ile IL-13 ve IL-4 genlerinin transkripsiyonu gerçekleşir ve de IL-13'ün makrofaj, monosit ve fibroblastlara olan etkilerinin, RS hücreleri için önemli olan çevrenin oluşumunda rol aldığı bilinmektedir.^{175,176}

Hodgkin ve RS hücrelerinde etkili bir diğer transkripsiyon faktörü de AP-1'dir. AP-1 birçok hücre dışı sinyal yoluyla stimüle edilir, hücresel proliferasyon, apoptozis ve diferansiyasyonu regüle eder.¹⁷⁷ Hodgkin primer hücre ve hücre dizilerinde AP-1 transkripsiyon faktörü, c-jun ve jun-B ekspresyonunu artırır. jun-B artışı ile NF-κB aktivasyonunun arttığı da rapor edilmiştir.¹⁷⁸

2.7. Hodgkin Lenfomada Klinik

HL'lı hastaların çoğu ağrısız, lokalize lenfadenopati ile gelirler (% 90'ı), sıklıkla ele ayrı ayrı, lastik kıvamında gelir, hassasiyet enderdir ve tipik tutulum yeri servikal bölgedir(% 80). İlk gelişte mediastinal bölgenin % 60, aksiler bölgenin % 6-20, inguinal bölgenin %6 oranında tutulduğu bildirilmiştir.¹⁷⁹ Klasik HL olgularında lenf nodunun boyutu 2 ila 5 cm arasında değişmektedir. MS HL ve LF HL olgularında lenf nodları genellikle mobil olma eğilimindedir. Bu olgularda lenf nodlarının komşu dokulara yapışık olması söz konusu değildir. NS HL'da ise lenf nodu komşu dokulara yapışık olabilir ve tutulmuş lenf nodu genellikle daha sert olma eğilimindedir. Hastaların % 20'sinde ise lenfadenopati (LAP) diyafragma altındadır.¹⁸⁰ HL lenfatik drenaj yoluna uygun olarak sıralı bir şekilde bir lenf bezinden diğerine yayılır ve NHL görülen eş zamanlı birçok lenf bölgesinin tutulumu HL için nadirdir. Genelde sol supraklaviküler lenf nodu tutulumunu abdominal paraaortik lenf nodu tutulumu takip eder. Sağ supraklaviküler lenf nodu tutulumu mediastinal adenopati ile ilişkili olmaya

eğilimlidir. Paraaortik lenf nodu tutulumu sıklıkla dalak tutulumu ile birliktedir ve takiben karaciğer ve/veya kemik iliği tutulumuyla da birlikte görülür. Histopatolojik tiplerin içinde komşuluk yoluyla yayılım eğilimi en sık NS tipindedir.¹⁸¹

LZ HL klasik HL'nın en iyi prognozlu histolojik alt grubunu oluşturmaktadır. Genellikle erken evrede tanı konur. Periferik lenf nodundan başlar, mediyaasten tutulumu nadirdir. NHL özellikle de DBBHL'a dönüşme riski veya nüks gelişme riski diğer histopatolojik alt gruplardan daha fazladır. Buna rağmen 10 yıllık sağkalım % 90'ın üzerindedir.

NS genç hastaların % 40'ı, erişkin hastaların % 70'inde görülen en sık rastlanılan HL alt tipidir. NS HL gelişmiş ülkelerde en sık görülen tiptir. Mediyaasten ve servikal lenf nodu tutulumu sıktır. Daha çok genç bayanlarda görülür. İyi prognozlu histopatolojik alt gruplardan biridir.

MS gelişmekte olan ülkelerde ve AIDS'li hastalarda en sık görülen tiptir. Her yaşta, özellikle orta yaşlarda görülür. LZ ve NS histopatolojik tiplere göre daha kötü seyir gösterir. 10 yaş ve altındaki çocuklarda sıktır, sıklıkla ektranodal tutulumlu ve ileri evre hastalık olarak klinik bulgu verir.¹⁸²

LF HL, tanı konduğunda sıklıkla ileri evrededir, ileri yaşta görülür ve genellikle yaygın hastalık şeklindedir. Lenfositten yoksun tip en az görülen ve prognozu en kötü olan histopatolojik tiptir.¹⁸³⁻¹⁸⁵ LF HL çocuklarda nadirdir, HIV ile enfekte hastalarda sık rastlanır. Klasik HL'nin bu alt tipine özellikle hem HIV ile hem de EBV ile enfekte hastalarda rastlanır.¹⁸⁶ LF HL kemik ve kemik iliğini tutan yaygın hastalık olarak klinik bulgu verir. Tüm HL olgularının % 1'ini oluşturmaktadır. Tanı anında "B" semptomu görülme sıklığı yüksek oranda izlenmektedir.¹⁸⁷

NLP HL'da kronik, asemptomatik, santralden ziyade diyafragmanın altı ve üstünde periferik lenf nodu tutulumu vardır ve fizik muayenede kolaylıkla saptanır. NLP HL'da tutulmuş lenf nodu çapı, klasik HL'dan daha büyüktür ve çap genellikle 2 ila 8 cm arasında değişmektedir. Hastalığın tanı anındaki yayılım özelliği dikkate alındığında, NLP HL yaygın olmaktan ziyade, sıklıkla lokalize bir hastalık olarak ortaya çıkmaktadır. Hastalık nadiren gruplar halinde lenf nodu tutulumuna neden olmaktadır. NLP HL, genellikle tek bir servikal, aksiller veya inguinal lenf nodunu tutma eğilimindedir. NLP HL, kadınlara oranla erkeklerde daha sık görülmektedir. Mediastinal kitle % 2-7'de vardır.¹⁸⁸⁻¹⁹⁰ B semptomu % 6-15'de nadiren bulunur.²⁵

Dalak (% 8), karaciğer (% 2-3), kemik iliği (% 1-2), akciğer (% 1-4) ve iskelet sistemi (% 1-3) daha nadir tutulur.^{25,191,192} Vakaların % 75'i evre I-II ile gelirken klasik HL için bu oran % 50-60'dır.¹⁸⁹ Klinik seyir, prognoz ve yaşam süresi diğer HLtiplerinden daha iyidir.¹⁹³

Mediyastinal hastalık NS HL olgularında sık rastlanan bir bulgudur. Mediyastinal lenfadenopatisi olan hastalar (tüm vakaların % 60'ı), klinik olarak asemptomatik olabileceği gibi nonproduktif öksürük, soluk borusu veya bronş basısına bağlı bulgular da gösterebilir. Mediyastinumda en çok paratrakeal ve trakeobronşial lenf nodu grupları tutulur. Ön mediastinal LAP'in vena kava superiora basısı nedeni ile yüzde şişme ve baş-boyun venlerinde genişleme görülebilir. Geniş mediastinal kiteli hastalarda daha küçük kiteli hastalara göre nüks daha sıktır. Sırt ağrısı, kemik ağrıları ve spinal kord kompresyon semptom ve bulguları tespit edilebilir. Santral sinir sisteminde (SSS) parankimal veya meningeal tutulum nadirdir. Genellikle gidiş şekli boyundan mediastene, çölyak lenf nodlarına, buradan da dalak, karaciğer ve kemik iliğine doğrudur. Timus bazen HL'nin tek köken aldığı yer olabilir ve buna noduler sklerozan varyantlı genç hastalarda rastlanır.¹⁵

HL'da diffüz hematojen yayılımdan önceki son aşama dalak tutulumudur. Bu nedenle karaciğer tutulumu varsa dalak da mutlaka tutulmuştur. Kemik iliği tutulumu, yaygın hastalığı olan ve B semptomları bulunan kötü prognozlu histolojik alt gruplarda saptanır. Ender olarak kemik (genellikle osteolitik), böbrek ve akciğer parankim tutulumu da olabilir. Ancak HL'da primer ektranodal hastalık çok nadirdir.^{183-185,194,195} Dalak sıklıkla fizik muaynede büyümüş olarak ele gelir veya 99 m Tc-sulfür kolloid scan ile tesbit edilebilir. Bununla beraber dalağın büyüklüğü dalak tutulumunun bir göstergesi değildir. Splenektomi dalak tutulumunun kesin göstergesi için tek methodur. Vakaların % 13'ünde dalak subdiyafragmatik olarak tutulan tek yerdir. Laparotomi sırasında rezeke edilen dalakların % 26'sı tutulmuştur. Dalak tutulumunun sıklığı; NLP HL için % 16, NS HL için % 35, MS HL için % 59, LF HL için % 83'dür. Dalak tutulumu olan hastaların % 50'sinde hem paraaortik hem de dalak hilusundaki lenf nodları tutulmuştur.¹⁵

Ateş (38 °C ve üzeri), gece terlemesi ve son 6 ayda % 10'dan fazla kilo kaybı, B semptomları olarak tanımlanır. HL'da olguların % 25-40'ında B semptomları saptanır. En sık saptanan bulgu ateştir. Ateş tanı anında hastaların % 27'sinde görülür ve

genellikle düşük derecede ve düzensizdir. 1-2 haftalık ateşli ve ateşsiz dönemleri izleyen, yüksek derecede ateş izlenebilir. Yaygın kaşıntı, olguların % 10'unda başlangıç belirtisi olabilir, fakat prognostik önemi gösterilememiştir. B semptomları; tedavi seçimi, evreleme ve prognoz belirlenmesinde önemlidir.^{195,196} B semptomları, yaşlı hastalarda ve ileri evre hastalıkta daha sık görülmektedir.¹⁹⁶ Interleukin-2 (IL-2), IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13, fibroblast büyüme faktörü, TGF- β , TNF- α gibi bazı sitokinlerin HL'lı hastalarda görülen sistemik semptomlara neden oldukları düşünülmektedir.

Çeşitli paraneoplastik sendromlar tariflenmiştir; progresif multifokal lökoensefalopati, subakut serebellar dejenerasyon, nekrotizan myelopati, subakut duyusal ve motor nöropati, Gullain - Barre sendromu ve granulomatöz angitis bulguları tespit edilebilir.^{183-185,195}

Akciğerde hastalık mediastinal veya hiler tutulum olmadan oluşmaz. HL'lı hastaların üçte ikisinde intratorasik tutulum vardır. Akciğer tutulumu tüm vakaların %17'sinde saptanır. Plevral effüzyon mediastinum veya hiler bölgedeki lenfatik obstrüksiyondan kaynaklanabilir. Plevral tutulum olabilir, ancak Hodgkin dışı lenfomadaki insidansına göre göreceli olarak nadirdir.¹⁵

Nörolojik disfonksiyon genellikle geç bulgulardandır. Hastalık sinir sistemine ya paravertebral lenf nodlarından sinir köklerine ve kan damarlarına veya spinal kanaldaki perinöral lenfatiklerden intervertebral foraminallara ve benzer yolla intrakranial bölgeye yayılarak ya da hematogen yayılımla ulaşır. Santral nöron aksının tutulumu epiduraldır ve sinir sisteminin tutulan bölgesine göre bası semptomu verir. İntrakranial hastalıkta intrakranial basınç artışı bulgu ve semptomları ortaya çıkabilir veya hemiparezi, hemisensoriyal bozukluklar, fokal nöbetler, papilödem eşlik edebilir. Kafa kaidesi tutulduğunda kranial sinir tutulumu da olabilir.

Vertebral tutulumun majör komplikasyonu vertebraların çökmesi veya tümörün epidural aralığa uzanımından kaynaklanan spinal kompresyondur. Kemik tutulumunun olması kötü prognoz göstergesidir (tüm vakaların %2 'si). Semptomatik vakalarda, özellikle anemisi, lökopenisi veya trombositopenisi olan vakalarda kemik iliği tutulumu olabilir (vakaların % 5'i). Çoklu biyopsi endikasyonu vardır, çünkü HL kemik iliğini bölgesel şekilde tutmaya eğilimlidir.¹⁵

Sarılığın olması kötü prognozun belirtisidir ve terminal veya preterminal dönemi işaret eder. Hepatik tutulum oranı % 2'dir. Hepatik tutulumla bağlı sarılık geliştiğinde parankimal tutulumun Hodgkin lenfomaya mı bağlı veya porta hepatisin lenf nodu basısına mı bağlı olup olmadığı ayırt edilmelidir. Çoğu vakalarda sarılık, portal peribiliar infiltrasyonun intrahepatik tıkanıklık yapmasına bağlı gelişmiştir.¹⁸¹ Karaciğer tutulumu genellikle MS HL veya LF HL alt tipinde görülür

Cilt tutulumu iktiyozis ve hiperkeratoz, eritema nodozum, psöriatiform lezyonlar, ürtiker, lökositoklastik vaskülit, linear Ig A büllöz dermatit, dermatomyozit ve fatal toksikepidermal nekrolizisi kapsar. Cilt tutulumu % 0,5 -3,4 sıklıkta görülür.¹⁹⁷

HL'da en sık amiloidoz veya renal ven trombozunun eşlik etmediği nefrotik sendrom görülür. Minimal lezyon hastalığı veya lipoid nefroz en sık nedendir. Fakat membranöz ve membranoproliferatif glomerülerulonefrite bağlı nefrotik sendrom gelişen vakalar bildirilmiştir.¹⁸¹ HL'ya nefrotik sendrom dışında otoimmün hemolitik anemi, otoimmün nötrojeni, immün trombositopeni gibi otoimmün hastalıklar eşlik edebilir.¹⁸⁷ İmmün Trombositopenik Purpura (ITP), HL'lı vakaların % 1-2'sinde bildirilmiş olup, beraberinde otoimmün hemolitik anemi de eşlik edebilir. Trombositopeni HL tanısı sırasında, öncesinde veya sonrasında da gelişebilir. ITP sıklıkla tedavi sonrası iyileşme dönemimdeki hastalarda ortaya çıkar ve genellikle hastalığın tekrarı ile bağlantılı değildir.¹⁹⁸

HIV pozitif bireylerde tanı anında hastalık, sıklıkla subdiyafragmatik yayılım ve ektranodal tutulum ile karakterizedir. HIV pozitif HL olgularında mediastinal kitle varlığı HIV negatif hastalara oranla daha az sıklıkta izlenmektedir. HIV pozitif olgularda karaciğer ve kemik iliği tutulumu izlenebilir. Cilt ve mediastinal tutulum olmaksızın akciğer tutulumu HIV pozitif olgularda görülebilmektedir. Klinik seyir ve prognoz, HIV pozitif hastalarda HIV negatif hastalara oranla daha kötüdür.⁶²

2.8. Hodgkin Lenfomada Laboratuvar

Hematolojik olarak normositik ve normokromik anemi, nötrofili (% 50), eozinofili (% 15-20), lenfositopeni (ileri evre HL hastalarda hem B hem T lenfosit azalmasından kaynaklanan lenfositopeni) gözlenir.¹⁸¹ Biyokimyasal bulgular aktif hastalıkta, hastalığın yayılımını veya prognozunu belirler. Bunlar; artmış bakır seviyesi (aktif HL bulgusudur ancak serum bakır seviyesi aynı zamanda enfeksiyon, inflamatuvar

bozukluklar, hamilelik ve doğum kontrol hapı kullanan bireylerde de artmıştır), artmış sedimentasyon hızı (ESH) (aktif HL göstergesidir ve sedimentasyon hızının sürekli yüksek kalması kötü prognoza işaret eder. Sedimentasyon yüksekliği eşlik eden enfeksiyon ve inflamasyonun da bulgusu olabilir), artmış serum ferritin ve azalmış serum transferrin seviyesi (bu belirgin olarak ileri evre HL ile ilişkilidir), artmış CRP seviyesi, artmış fibrinojen seviyesi, artmış haptoglobulin seviyesi, artmış serum alkalen fosfataz seviyesi (bu kemik veya karaciğer tutulumunun göstergesi olabilir), artmış Laktat Dehidrogenaz (LDH) seviyesi, artmış serum-soluble interlökin 2 reseptör (sIL-2R) seviyesi (teşhiste artmış seviye tedavi başarısızlığında artmış risk ile korrelasyon gösterir), azalmış Albümin seviyesi, artmış beta 2 mikroglobulin (HL'lı hastaların tümör evresi ile korelasyon gösterir ve artmış seviye kötü prognoza işaret eder.^{181,184,199}

Hodgkin Lenfomalı hastaların tablo ortaya çıktığında veya iyileşme döneminde T hücre fonksiyonlarında süreklilik gösteren bozukluk vardır. Tedavisiz hastalarda doğal öldürücü hücre aracılı sitotoksite azalmıştır. Hücresel immun bozukluk supresör monositler, T-supresör hücrelerin artmış hassasiyeti ve artmış IL-12 seviyesi sonucudur. İlerlemiş hastalığı olan hastalarda kalıcı T lenfosit bozukluğu vardır. RS hücreleri mitojenle indüklenen hücelere antijen sunan hücre olarak fonksiyon görür. İmmünolojik parametreler genellikle başarılı tedavi sonrası normale dönse de T hücre fonksiyon bozukluğu yıllarca sürebilir. T hücre eksikliğinin HL'da sitokinlerin üretimine bağlı olarak geliştiği ve bunun da T hücre cevapsızlığına yol açabileceği öne sürülmektedir.²⁰⁰ B lenfosit fonksiyonu tedavi sonrası geçici olarak azalmıştır. Hastaları splenektomiden önce pneumokok ve haemophilus influenzae tip B aşıları ile aşılama gerekir, çünkü splenektomi sonrası bu antijenlere immun cevap bozulur. İleri evre HL'lı hastalarda hem B hem T lenfosit azalmasından kaynaklanan lenfositopeni gözlenir.¹⁵

2.9. Hodgkin Lenfomada Tanı

HL'da tanı tutulmuş dokuların değerlendirilmesi genellikle de lenf nodu biyopsileri ile konur, eksizyonel biyopsiler tavsiye edilir, bazı seçilmiş vakalarda biyopsiler yeterli olabilirken ince iğne biyopsiler önerilmemektedir. İnce iğne aspirasyon biyopsisi tanı için gerekli olan RS hücrelerinin tanınmasına çoğu kez olanak sağlamamaktadır. HL tanısında histolojik alt tipin belirlenmesi ve diğer hastalıklardan ayırıcı tanısının yapılabilmesi için en önemli işlemlerden biri taze doku örneğinde

immunohistokimyasal çalışma yapılmasıdır. Biyopsi değerlendirilmesi hem rutin ışık mikroskopisi ile hem de immunhistokimya ile immunfenotip analizini içermelidir. İmmunfenotipik analiz hem neoplastik hücelere hem zemindeki infiltrata yapılsa HL ve subtiplerinin daha iyi tanımlanmasına yardımcı olur. Aynı zamanda HL ve 2 morfolojik benzer olan agresif NHL (T Hücreden Zengin Büyük B Hücreli Lenfoma – THZBBHL- ve Anaplastik Büyük Hücreli Lenfoma-ABHL) arasında ayırımı da önemlidir.¹¹² Klasik HL tipik olarak CD 15 ve CD 30 eksprese eder, CD 20 ekspresyonu değişkendir, CD 3 ve CD 45 eksprese etmez. CD 15 saptanmaması HL tanısını ekarte ettirmez fakat hem CD15 hem CD 30 yokluğu ve CD 20 ekspresyonu LZ HL, NLP HL veya B hücreli lenfomaların olağan dışı bir varyantını(THZBBHL) düşündürür ve yeniden değerlendirmeyi gerektirir. T hücre antijen ekspresyonu olağan dışıdır ve hem yeniden incelenmeyi gerektirir hem de T hücreli NHL dışlanması için T Hücre reseptör gen moleküler genetik analizini yapmak gerekir.

NLP HL’da tanıda; kısmi ve tam nodüler büyüme paterni zemini içinde L&H Hücrelerinin olması, zeminde küçük B lenfositleri, CD 3, CD 4, CD 57 (+) T lenfositleri, CD 21 ve CD 23 (+) foliküler dendritik hücrelerin olduğu, karakteristik L&H hücrelerinin immunfenotipik özellikleri CD 20, Bcl 6 (+), CD 15 ve CD 30 (-) vardır. Epitelyal Membran Antijen (EMA) ve diğer B hücre yüzey markerları (CD 79a, BOB-1 ve OCT-2 transkripsiyon faktörleri gibi) zor vakalar için yardımcı olabilir.

2.10. Hodgkin Lenfomada Ayırıcı Tanı

Klasik HL’nın ayıcı tanısına NLP HL ve diğer NHL girmektedir. LZ HL ve NLP HL; erken evre hastalık predominansı olması, bulky hastalık olmaması, B semptom yokluğu gibi benzer klinik prezentasyonlara sahip olabilir. Ayrıca küçük B hücreleri zemininde L&H Hücreleri içeren benzer morfolojik özelliklere de sahip olabilirler. Ayırımında anahtar özellik malign hücrede immunfenotiptir. NLP HL’nın aksine LZ HL malign hücreleri klasik HL immunfenotipik profiline sahiptir. Ek olarak NLP HL’da EBV (-) iken, LZ HL’da % 40 EBV (+) vardır. ABHL’yı LF HL’nın retiküler varyantından ayırmak zor olabilir.^{102,103} HL’da CD 1, CD 30 ve PAX/BSAP pozitif iken ABHL’de CD 15 ve PAX/BSAP negatif CD 30 pozitifdir. HL’da T hücre antijenleri ve Anaplastik Lenfoma Kinaz (ALK) negatifken ABHL’de pozitif veya negatif olabilir. NS HL ile primer mediastinal B hücreli lenfoma (PMBHL) (DBBHL subtipi) klinik ve

patolojik özellikleri paylaşırlar. Her ikisi de genç kadınlarda yaygındır ve mediastinal bir kitle olarak gelirler. Biyopside PMBHL, HL'nın neoplastik RS hücrelerine benzeyen hücrelere sahip olabilirler, gen ekspresyon profili benzerlik gösterebilir. PMBHL'da HL'nın tersine B hücre antijenleri eksprese olurken, CD 30 zayıf ekspresyona sahiptir, CD 15 ekspresyonu ise nadirdir. Yine de HL ve PMBHL'nın kombine özelliklerini taşıyan vakalar da vardır ve bunlar B hücreli Lenfoma sınıflandırılmayan veya DBBHL ile klasik HL arası özellik gösteren olarak tanımlanır. THZBBHL'da ayırıcı tanıda düşünülmelidir. THRLBCL orta yaşlı erkeklerde yaygındır, HL'da tümör hücreleri total sellülaritenin küçük bir kısmını oluşturur. Buradaki B hücreleri tipik olarak DBBHL benzer immunfenotipe (CD 15-, CD 30-, B hücre belirteçleri+, EBV-) sahiptir. NLP HL ayırı tanısına hem malign hem malign olmayan LAP nedenleri girer. Açıklanamayan asemptomatik ısrarlı veya rekürrent LAP ile giden reaktif hiperplazi veya germinal merkezin progresif transformasyonu ayırıcı tanıda düşünülür.^{201,202} THZBBHL'da morfolojik ve immunofenotipik olarak NLP HL'a benzerler.²⁰³ THZBBHL'da zeminde CD 8(+) sitotoksik T hücreleri ve makrofajlar vardır, foliküler dendritik hücreler yoktur. Ayrıca NLP HL'da büyüme paterni en azından bir kısmında nodüler iken THZBBHL'da diffüz büyüme baskındır.¹⁶ LZ HL'da erken evrede olması, bulky olmaması, B semptomu olmaması ve klasik HL diğer tiplerine göre daha iyi prognozu nedeniyle NLP HL ile karışabilir.^{16,204}

HL diğer inflamatuvar lenfadenopati yapan sebeplerden, özellikle de atipik mikobakteriyel enfeksiyonlar ve toksoplazmozdan ayırt edilmelidir. Başlangıçta enfeksiyöz mononükleoz veya reaktif lenfadenopati olarak tanı almış biyopsiler, tablo tekrarlıyor ve sebat ediyorsa lenfoma olarak teşhis edilir. Hodgkin Lenfomadaki servikal lenfadenopati mutlaka diğer bir primer tümörün (nazofaringeal karsinom, yumuşak doku sarkomu) metastatik adenopatisinden ayırt edilmelidir.²⁰⁵

CD45, eritroid hücreler ve megakaryositler dışında hemen hemen tüm hematolenfoid hücreleri gösterebilen molekül ailesine karşı oluşturulmuş bir grup antikoru değerlendirmektedir. Bu nedenle "*leukocyte common antigen*" (LCA) kullanılır. LCA genelde negatif bir belirleyici olmakla birlikte olguların % 7'sinde pozitif bulunabilir. Bu durumda ABHL gibi bazı NHL olguları ile karıştırılabilir.

RS hücreleri ve varyantlarının CD30 ile boyanması tüm klasik HL olgularında görülmektedir. HL olguları genellikle CD30 ile kuvvetli boyanma paterni

göstermektedir. Bu boyanma paterni membranöz ve/veya paranükleer boyanma şeklinde olabilir. Sitoplazmik boyanma nadir olarak izlenmektedir. CD30, aynı zamanda ABHL ve kutanöz lenfoproliferatif hastalıklarda bulunabilir.

CD15 antikoru matür nötrofilde, bazı makrofajlarda ve bazı T hücre alt gruplarında pozitif olarak bulunabilmektedir. CD15 boyanma paterni, CD30 boyanma paternine benzerdir. CD15 negatif olan HL olguları sıklıkla ileri yaş, erkek ve ileri evrede tanı almaktadır. NS HL olguları ile karşılaştırıldığında MS HL olgularında daha yüksek oranda CD15 negatifliği gözlenmektedir.¹¹¹ CD30 (+), CD20 (-) ve CD15 (-) olguların sağkalım oranları CD30 (+), CD20 (-) ve CD15 (+) olgularla karşılaştırıldığında daha düşük olduğu görülmektedir. Çok değişkenli analizde HL olgularında CD15 negatifliğinin bağımsız bir kötü prognostik faktör olduğu bulunmuştur.^{206,207}

2.11. Hodgkin Lenfomada Evreleme

Evrelemede amaç hastalığın yayılımının belirlenmesi, prognostik faktörlere katkısı ve ilişkisini bilmek ve tedavi etkinliğini belirlemek için tedavi süresince tekrar değerlendirilebilir başlangıç hastalık değerlendirmesini sağlamaktır. TNM solid tümörler için uygun olsa da lenfomalar için uygun değildir. HL için kullanılan evreleme anatomik klasifikasyondur. Yayılımı da bir lenf nodundan lenfatik kanallar yoluyla yakın bir lenf noduna doğrudur. HL Ann-Arbor Evreleme sisteminin Costwolds Modifikasyonu (1988'de) ile evrelendirilir.^{208,209} Hastalar hem klinik hem de çok daha az sıklıkla patolojik olarak tutulum alanları, sayıları, sistemik semptomlar, bulky hastalık veya yaygın hastalık varlığına göre 4 evreye ayrılır (tablo 5). B semptomu olarak bu vakalar 3 sistemik semptomun bir veya daha fazlasının olmasına göre de subklasifiye edilir. Evreleme araştırmalarından önceki 6 ay içinde total vucut ağırlığının % 10'dan fazlasının açıklanamayan kaybı, son bir ay içinde açıklanamayan ısrarlı ve tekrarlayıcı 38 °C üstünde ateş, son bir ay içinde tekrarlayıcı gece terlemesi B semptomlarını oluşturur. B semptomları genellikle ilerlemiş hastalık, bulky hastalık ve kötü prognozla ilişkilidir. Ateş ve kilo kaybının, gece terlemesinden daha çok prognostik önemi vardır.²¹⁰⁻²¹² Diğer semptomlar HL ile ilişkili olabilir fakat B semptomu olarak sınıflanmazlar, bunlardan bazıları kaşıntı, alkolle indüklenen ağrı gibi semptomların prognostik önemi ortaya çıkabilir.²¹³ Bulky hastalık varlığında X simgesi

kullanılır. Bulky hastalık değişik araştırıcı gruplar arasında farklı şekilde tanımlanır. Cotswolds modifikasyonuna göre bulky hastalık 2 bulgudan birinin mevcudiyeti ile tanımlanır. Birincisi; Bilgisayrlı Tomografi (BT)-Manyetik Rezonans (MR) veya Ultrasonografi (USG) ile belirlenmiş en büyük çapı 10 cm ve üstünde olan nodal kitle veya abdominal nod, ikincisi; posteroanterior göğüs radyografisinde belirlenen T5-6 seviyesinden geçen toraksın internal trasvers çapının üçte birinden daha büyük ve eşit maksimum genişliğe sahip mediastinal kitledir. Eğer göğüs radyografisi yapılmamışsa BT’de belirtilmiş mediastinal kitlenin toraksın internal transvers çapının üçte birinden büyük olması veya 10 cm’den büyük olması ile tanımlanır. Ayakta dik pozisyonda çekilen göğüs radyografisi mediastinal bulky için tercih edilen modalitedir. Karaciğer ve dalaktaki lezyonlar, bulky hastalığın tespitinin bir parçası olarak ölçölmez. Diğer bulky hastalık tanımlamaları kötü prognozlu hastaları tanımlamada kullanılmaktadır ve cut off değeri 5-6 cm’dir.²¹⁴⁻²¹⁶ Stanford protokolünde bulky hastalık 5 cm ve daha büyük olarak tanımlanmıştır ve KT tamamlandıktan sonra tutulu alan RT’si gerektirir. Eğer sınırlı ektranodal yayılım belirlenmişse E simgesi kullanılır. Sınırlı ektranodal yayılım yakın nodal alandan sınırlı direk yayılım ile diyafragmanın aynı tarafında ekstralenfatik doku tutulumu ile veya bir bölgesel lenf nodundan yayılım ile bağıntılı tek ektranodal tutulumun ayrıık görünümu olarak tanımlanabilir. Eğer tek ekstralenfatik bölge hastalığın tek bölgesi ise evre IE olarak tanımlanır. Daha çok yaygın ektranodal hastalık varlığında evre 4 hastalık kabul edilir.

Klinik evre ve patolojik evre terminolojileri, hastalığın anatomik evrelerinin belirlenmesinde kullanılan testleri göstermede kullanılmaktadır. Klinik evreleme tanısal biyopsi sonrası tanısal diagnostik testler ile hastalığın yayılımının belirlenmesidir. Hikaye, fizik muayene ve görüntölleme yöntemlerini kapsar. Pozitron Emisyon Tomografisi- Bilgisayrlı Tomografi (PET-BT) yayılımı sıklıkla belirler fakat çoğunda servikal ve/veya supraklavikular nodal tutulum olan HL için RT tedavi planı için bir detay sağlayamaz, bu yüzden özellikle boyunun BT ile değerlendirilmesi gerekebilir. BT’lere ilaveten bulky hastalığın varlığını saptamada tercih edilen yöntem olduğu için göğüs radyografileri alınmalıdır. Karaciğer ve dalak tutulumu şüphesi olan olgularda batın, MR görüntölleme yöntemi ile değerlendirilebilir. MR ayrıca spinal kord basısı, kemik ve/veya kemik iliği tutulumunu belirlemede duyarlı bir tetkiktir. Ancak evrelendirme amacıyla kullanımı sınırlıdır. PET-BT başlangıç evrelendirme tetkikleri

içinde en duyarlı olan tetkik olarak bilinmektedir. Özellikle ektranodal hastalığın belirlenmesinde faydalıdır. HL olgularının yaklaşık % 25'inde hastalık evresinin değişmesine neden olabilir.²¹⁷ Tedaviye yanıtın erken dönemde PET ile saptanması, uzun süreli remisyon ve hastalıksız sağkalımın en önemli göstergesidir. Aynı şekilde tedavi sonrası BT ile izlenen rezidüel hastalığın değerlendirilmesinde, PET ile tutulumun olmaması fibrotik rezidüel doku ile iyileşmenin gerçekleştiğinin kanıtıdır ve bu sayede gereksiz olarak ek doz veya farklı bir rejim ile tedavinin önüne geçilmesi mümkündür. İzlem ve relapsın belirlenmesinde de PET son derece kullanışlı bir tetkiktir. Özellikle KT ve RT'ye bağlı fibrozis ve diğer sekellerin hastalıktan ayrımını yapmak için son derece yararlıdır.²¹⁷ Tek taraflı kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi özellikle evre 3-4 hastalar için ve B semptomu olanlar için yapılmalıdır. HL'da kemik iliği tutulumu fokal ve genellikle fibrozis ile birlikte olduğu için biyopsi yapmak gerekir, sadece aspirasyon yetersizdir. Patolojik evre splenektomi ile evreleme laparatomisi, karaciğer biyopsisi, multipl lenf nodu biyopsileri ve kemik iliği biyopsileri vasıtasıyla evrelemeyi sağlar fakat yüksek morbitidesi ve gelişmiş görüntüleme yöntemlerine bağlı olarak terk edilmiştir ve artık tarihsel önemi vardır.^{218,219} Olumlu prognostik özelliği olan hastalar için yaşam avantajı yoktur.²²⁰⁻²²²

Evreleme amacıyla tutulan lenf nodları tek bir radyasyon alanını kapsayan anatomik bölgelere ayrılır.

- 1- Waldeyer Halkası (tonsil, dil tabanı, nazofarenks)
- 2- İpsilateral servikal, supraklavikular, oksipital, preaurikular
- 3- İnfraklavikular
- 4- Aksiller pektoral
- 5- Mediastinal (Timus, prevaskuleri, aortapulmoner, paratrakeal, pretrakeal, subkarinal ve posterior mediastinal)
- 6- Hiler
- 7- Paraaortik
- 8- Dalak
- 9- İliak
- 10- İpsilateral inguinal ve femoral
- 11- Epitroklear ve brakiyal

Mediastinum içindeki tüm nodal hastalıklar tek bir lenf nodu bölgesi olarak düşünülür, hiler nodlar ayrı olarak düşünülmelidir ve lateralize edilmelidir. Diyafragmanın ve göğüs duvarının bir kısmının drenajını yapan internal mamariyan nodlar ve posterior mediastende olmasına rağmen aynı zamanda göğüs duvarı ve diyafragmayı drene eden paravertebral nodlar mediastinal nod kabul edilir. En az iki görüntüleme yöntemi ile belirlenen ve ne kistik ne de vasküler olmayan multipl fokal defektler olduğu zaman dalak ve karaciğer tutulumundan bahsedilebilir. Tek başına karaciğer büyüklüğü, karaciğer fonksiyon testi karaciğer tutulumu için yeterli değildir. Dalak büyüklüğü de dalak tutulumunun bir göstergesi değildir. Dalak tutulumunun sıklığı histopatolojik tip ile korelasyon gösterir. Dalak tutulumu olan hastaların % 50'sinde hem paraaortik hem de dalak hilusundaki lenf nodları tutulmuştur.²²³ Akciğer tutulumundan, hem PET ile hem BT ile radyolojik olarak kanıtlanmış ve özellikle enfeksiyon gibi diğer olası nedenlerin dışlandığı parankimal tutulum olduğunda bahsedilebilir. Kemik tutulumu, alkalen fosfataz yüksekliği ve kemiklerde ağrı öyküsü olduğunda MR, BT ve Sintigrafi gibi yöntemlerle radyolojik değişikliklerin kanıtlanması ile desteklenmelidir. İntrakranial tutulum klinik prezantasyonda nadirdir. Spinal intradural tutulumlar, spinal kord ve meningeal tutulumlar MR, BT, Myelografi ve radyografiler ile desteklenen bulgularla beraber klinik öykü temelinde SSS tutulumundan bahsedilebilir.

Tablo 5. HL İçin Ann Arbor Evrelendirmesi Cotswolds Modifikasyonu

EVRE I : Tek lenf nodu bölgesi (I), veya lenfoid yapı (dalak, timus, Waldeyer halkası), veya tek ekstralenfatik organ veya bölgenin lokalize tutulumu (IE)
EVRE II : Diyaframın aynı tarafında iki veya daha fazla lenf nodu bölgesi (II), veya tek komşu ekstralenfatik organ veya bölgenin bölgesel lenf nodları ile birlikte (ve/veya diyaframın aynı tarafında başka lenf nodu bölgeleri) tutulumu (IIE).
EVRE III : Diyaframın her iki tarafında lenf nodu tutulumu (III), ekstralenfatik organ veya bölgenin lokalize tutulumu (IIIE) birlikte olabilir. Splenik tutulum varsa (IIIS), ekstralenfatik organ veya bölgenin lokalize tutulumu ile birlikte ise (IIIS+E)
III-1 Tutulumun dalak, karaciğer hilusu veya çölyak lenf nodlarında sınırlı kalması
III-2 Paraaortik, iliak, mezenterik lenf nodları tutulumu
EVRE IV : Bir veya daha fazla ekstralenfatik bölgenin dissemine (multifokal) tutulumu ve/veya komşu lenf nodu tutulumu veya bölgesel olmayan uzak lenf nodu tutulumu ile birlikte izole ekstralenfatik organ tutulumu

A: Sistemik semptom yok

B: "B" semptomu var (ateş >38° C, çamaşır değiştirecek kadar gece terlemesi veya son 6 ay içinde vücut ağırlığının %10'unu aşan sebebi açıklanamayan kilo kaybı)

X: Bulky hastalık (T5-6 düzeyinde mediasteninin >1/3'ünden daha geniş veya >10 cm çapta kitle varlığı)

E: Tek bir ekstralenfatik (ekstranodal) alan tutulumu

S: Dalak tutulumu

2.12. Hodgkin Lenfomada Prognoz

Tanı anındaki hastalık evresi ve “B”semptomu varlığı en önemli prognostik faktörler olarak görülmektedir. Bulky hastalık (>10 cm) son zamanlarda üçüncü bir prognostik faktör olarak kabul görmüştür. Gerek ABD gerek Avrupa’da hastalık evresi (erken evre veya ileri evre) ve prognostik faktörlere (olumlu veya olumsuz prognostik faktörler) göre HL olguları tedavi edilmektedir. Erken evre olgularda, kötü prognostik olarak belirlenen faktörlerden sadece birinin varlığı, olgunun olumsuz prognostik faktörlü kategorisine aktarılması için yeterli olarak kabul edilmektedir. İleri evre (evre III veya IV) olgularda ise prognozu belirlemek için IPS kriterleri kullanılmaktadır.²²⁴

2.12.1. Hodgkin Lenfomada İleri Evrede Prognostik Faktörler

Yaş, ileri evre HL olgularında komorbid hastalıklardan etkilenmeksizin bağımsız bir prognostik faktördür. Erkek cinsiyetin de ileri evre HL olguları için bağımsız bir kötü prognostik faktör olduğu gösterilmiştir.^{225,226} Tümör yükü fazla olan hastalar kötü prognoza sahiptirler.²²⁷ İnguinal lenf nodu tutulumu bağımsız prognostik bir faktör olarak tanımlanmıştır ve maksimal nodal yayılımın bir göstergesi olarak kullanılabilir. Çok büyük mediastinal bulky hastalık, tek başına kötü prognostik bir faktördür.²²⁸ Evre en önemli prognostik faktördür, ilerleyici evre özellikle evre IV ve yaygın ektranodal yayılım gösteren HL olguları da ileri evre hastalık için kötü prognoza sahiptirler.^{229,230} Kemik iliği tutulumu ise HL olgularında başlı başına kötü bir prognostik faktördür.²³¹ Plevra, akciğer ve karaciğer tutulumunun kötü prognostik faktör olduğunu gösteren çalışmalar²³² olduğu gibi, tam aksini savunan çalışmalar da bulunmaktadır.^{227,228} Sistemik semptomlar, laboratuvar bulguları (ESH, ferritin, hemoglobin seviyesi, serum albumin ve serum CD8 antijen seviyesi kötü prognostik faktörlerdendir), total remisyon (total remisyondaki hastalar remisyonu olmayan ve parsiyel remisyonu olan hastalara göre daha iyi prognozu vardır) prognostik değeri vardır.^{223,233-235} Histopatoloji olarak iyi prognozdan kötü prognaza doğru sıralarsak; LZ>NS>MS>LF belirtilir. NLP HL diffuz içermeyen % 10 vakada B hücre kaynaklı NHL gelişebilir. NLP HL diffuz tip relaps nadir görülür. Fakat bir kere hastalığın tekrarı olursa histolojik olarak daha agresiftir ve kısalmış sağ kalımı işaret eder. LF nodüler sklerozan tip düşük sağ kalım oranına sahiptir. LF HL en agresif tipidir. İleri yaşlarda

ve kadınlara oranla erkeklerde daha sık görülür. Daha çok evre III ve evre IV olarak saptanır.²²³

Birçok çalışmada, başlangıç tedavisinde daha intensif tedavilerden fayda görebilecek kişileri tanımlamada, ilk relaps için yüksek riskli kişileri tanımlamak için prognostik faktörler kullanılmıştır. IPS bu amaçla kullanılan güçlü belirleyici ve kolay uygulanabilir bir skordur. IPS, tanıda 7 potansiyel olumsuz özelliği dayandırılarak hesap edilen ve HL'lı hastalar için tedavi sonuçlarını belirleyicidir.²³⁶ Burada 0-7 arası puanlama yapılır ve puanın artması riskin artışının göstergesidir. RT'li veya RT'siz kombinasyon KT'si ile tedavi edilmiş 5141 HL hastaya uygulandığında 5 yıllık olaysız yaşam oranı ve IPS ile ilişkisi tablo 6'da verilmiştir. Başka bir çalışmada 1980-2010 arasında Adriamisin, bleomisin, vinblastin, dakarbazin (ABVD) ile küratif tedavi edilmiş ileri evre HL'lı 740 hastada Hastalısız Sağkalım (HSK) ve Genel Sağkalım GSK için daha doğru bir tahmin sağlanmıştır.²³⁷ (tablo 7). IPS hemopoetik transplantasyon yapılan HL'lı hastaların prognozunu tahminde de güvenli bulunmuştur. 10 yıllık EFS oranlarına bakıldığında 0-1 puan olalar için % 38, 2-3 puan için % 23, 4 ve üzeri puan için % 7 saptanmıştır.²³⁸

Tablo 6.* İleri Evre HL Hastalarda IPI'a Göre 5 Yıllık HSK, GSK (1998)

Skor	5 Yıllık HSK, Yüzde	5 Yıllık GSK, Yüzde	Hastaların Yüzdesi
0	84	89	7
1	77	90	22
2	67	81	29
3	60	78	23
4	51	61	12
5 ve üstü	42	56	7

*Hasenclever, D, Diehl, V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. N.Engl. J.Med 1998; 339:1506.

Tablo 7.* İleri Evre HL Hastalarda IPI'a Göre 5 Yıllık HSK, GSK (2012)

Skor	5 Yıllık HSK, Yüzde	5 Yıllık GSK, Yüzde	Hastaların Yüzdesi
0	88	98	8
1	84	97	26
2	80	91	26
3	74	88	21
4	67	85	12
5 ve üstü	62	67	7

*Moccia AA, Donaldson J, Chhanabhai M, et al. International Prognostic Score in Advanced-Stage Hodgkin's Lymphoma: Altered Utility in the Modern Era. J Clin Oncol 2012; 30:3383.

2.12.2. Hodgkin Lenfomada Erken Evrede Prognostik Faktörler

Evre I-II hastalığı olan hastalar arasında olumlu ve olumsuz prognostik hastalık olarak başka bir sınıflama daha vardır. Bu sınıflama hastanın yaşı, B semptomları ve geniş mediastinal adenopatinin varlığına bağlıdır. Bu prognostik faktörlere bağlı olarak yapılan sınıflama özellikle evre I-II olumlu prognostik grupta kematerapi (siklus sayısı ve yoğunluk) ve RT'nin (RT)(doz ve tutulu alan çapı) azalmasına yol açar. ABD'de birçok merkez olumlu prognostik gruba bulky hastalığı olmayan (>10 cm) evre I-II A hastalığı almıştır. Avrupa ise başka değişkenleri (yaş, sedimantasyon gibi) dahil etmiştir(tablo 8). The European Organization for the Research and Treatment of Cancer (EORTC) olumsuz prognostik klinik evre I-II hastalar için aşağıdaki aleyhte özelliklerden herhangi biri olmasını kabul etmiştir.²³⁹

- 1- Geniş mediastinal adenopati
- 2- 4 veya daha çok lenf nodu bölgesinin tutulması
- 3- Tanıda yaşı 50 üzerinde olması
- 4- B semptomu ve ESH 30mm/h veya B semptomu olmadan ESH 50 mm/h olması

The German Hodgkin's Study Group (GHSG) benzer olmakla beraber yaşı almamış ve 3 ve üzeri lenf bölgesi tutulumunu olumsuz faktör olarak almıştır. Olumlu prognostik faktörü olan hastalar modifiye KT'ye ilaveten tutulu alan RT'ye adayken bazı vakalar tek başına KT alırlar. Olumsuz prognostik faktörlü hastalar ise standart KT ve başlangıç tedavisi olarak tutulu alan RT almalıdır. Ann-Arbor'a göre göğüs duvarının en büyük intratorasik çapının üçte birinden büyük olması, Cotswolds'a göre maksimum çapı T5-6'dan geçen toraks transvers çapının üçte birinden büyük veya eşit olan mediastinal kitleler geniş mediastinal adenopati olarak tanımlanır ve relapsın artmış riskini gösteren majör prediktif faktördür. Daha kısa yaşam süresine neden olup olmadığı ile ilgili veriler çelişkilidir.²⁴⁰⁻²⁴² HL'lı ve tek başına RT alan 230 hasta içeren bir çalışmada geniş mediastinal adenopatisi olanlarda 10 yıllık rekürrens oranı % 55 iken olmayanlarda % 17 bulunmuştur.²⁴¹ Yaygın torasik HL'lı hastalarda rekürrenslerin çoğu diyafragmanın üstünde ektranodal alanlarda veya lenf nodlarında olur, çoğuda tedaviden sonra 3 yılda gelişir. Subdiyafragmatik rekürrens yaygın değildir.²⁴³⁻²⁴⁶ Bu hastalarda kombinasyon KT izleyen tutulu alan RT tedavi yaklaşımının uygun olduğu ve geniş mediastinal adenopatisi olan 172 hastalık bir seride 10 yıllık relapsızlık oranı

kombine tedavi yaklaşımında % 88 iken sadece RT alanlarda % 54'dür.^{243-244,246-247} Mediastinum dışında bulky hastalığın sonuç üzerine etkilerine ilişkin sınırlı bilgiler vardır. 6-7 cm üstündeki periferik nodu olanlarda daha yüksek relaps oranının olduğunu gösteren çelişkili bilgiler vardır.^{248,249} 40 yaş ve üzeri hastalıkta daha düşük yaşam oranı görülür fakat daha yüksek rekürrens oranı yoktur.^{239,20,242} Buna, relapsta daha az başarılı tedaviler ve HL'dan başka sebeplerden artmış mortalite riski gibi 2 faktör katkıda bulunuyor görülmektedir.²⁵⁰⁻²⁵⁴

Tablo 8. Farklı Çalışma Gruplarına Göre Erken Evre HL'da Olumsuz Prognostik Faktörler

European Organization for the Research and Treatment of Cancer (EORTC)
Geniş Mediastinal Adenopati (>1/3 max.transvers torasik çap, MTO>0,35) 4 veya daha çok lenf nodu bölgesi tutulumu Yaş≥50 B semptomu (+) ve ESH >30 mm/h veya B semptomu (-) ve ESH > 50 mm/h
The German Hodgkin's Study Group (GHSG)
Geniş Mediastinal Adenopati (>1/3 max.transvers torasik çap, MKO>0,33) 3 veya daha çok lenf nodu bölgesi tutulumu B semptomu (+) ve ESH >30 mm/h veya B semptomu (-) ve ESH > 50 mm/h Ekstranodal Hastalık
Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte (GELA)
Yaş≥45 Erkek Ekstranodal Hastalık Hb ≤ 10,5 g/dl Absolü Lenfosit sayısı ≤ 600 mg/mikroL Yüksek ESH B Semptomu
National Cancer Institute of Canada (NCIC)/ Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)
Geniş Mediastinal Adenopati (>1/3 max.transvers torasik çap, MKO>0,33) 4 veya daha çok tutulu alan Yaş≥40 ESH > 50 mm/h veya herhangi bir B semptomu MS veya LF Histoloji

Mediastinal Kitle Oranı (MKO): Max kitle çapı/max intratorasik çap

Mediastinal Torasik Oran (MTO):Mediastinal kitle max çap/T5-6'da intratorasik çap

Ateş ve kilo kaybı olan evre I-II HL'lı hastalarda yaşam ve relapssızlık oranı azalmıştır ve bu tek başına RT alan veya kombine tedavi alanlar için geçerlidir. Tek başına RT alanlar içinde, gece terlemesi olanlar ile gece terlemesi olmayan evre I-IIA hastalar karşılaştırıldığında prognozlar benzer çıkmıştır. Tek bir B semptomu olmasına göre rölatif relaps riski ateş için % 4,3, kilo kaybı için % 2,4, gece terlemesi için % 0,8 saptanmıştır.^{239,255-257}

NLP HL’da hastalık çok yavaş bir seyir göstermekte olup, son derece olumlu bir prognoza sahiptir. Hastaliksız dönem oldukça uzundur. Geç relaps, yüksek oranda görülmesine rağmen, genellikle tedaviye iyi yanıt vermektedir. NLPHL nadiren fatal seyredebilmektedir.¹¹⁰

2.13. Hodgkin Lenfomada Tedavi

1902’de X ışınlarının bulunmasından kısa bir süre sonra Hodgkin hastalığının RT’ye duyarlı olduğu bulunmuştur. RT hastalıkta kullanımı sonrası regresyonu takiben nüks ve ölümlerin görülmesinden dolayı yeni arayışlara gidilmiştir. Savaş yıllarında lenfositolitik bir ajan olan nitrojen mustard keşfedilmiştir. Sonraki iki dekatta kemoterapitiklerle yapılan çalışmalar sonucunda MOPP (Nitrogen mustard, vinkristin, prokarbazin, prednizon) dördü ilaç tedavisi ilk etkin, güvenli, sistemik tedavi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak MOPP tedavisi sonrası yan etki olarak AML ve infertilite vakaları görülmüştür. Bu yan etkileri azaltmak için 1970 yılında ABVD tedavi rejimi geliştirilmiştir. ABVD tedavi rejimi sonrası kardiyopulmoner toksisite tespit edilmiştir.²⁵⁸⁻²⁶² Tedavi, hastanın fizyolojik durumu, histolojik tip, klinik evre ve prognoza etkili faktörler göz önüne alınarak yapılır. HL’nin tedavisi kombine model tedavi olarak benimsenmiştir. Tedavi protokolü KT ve tutulmuş alan RT’sini kapsamaktadır.¹⁸¹ Tutulmuş alan RT’sinin hedefi uygun alanı tedavi ederken, bölgesel tekrarı engellemek ve geç etkileri en aza indirmektir.²⁶³ Seçilen vakalarda KT tek başına tedavi edici olabilir. Tek başına KT radyasyona bağlı büyüme komplikasyonlarını, tiroid ve kardiyopulmoner fonksiyon bozukluklarını ve KT’ye bağlı ikincil kanser gelişim riskini azaltır.¹⁸¹ En çok uygulanan, iyi tolere edilebilen, toksisitesi az ve etkin olan KT protokolü ABVD kombinasyonudur. İnfertilite riski, erken menopoiz ve ikincil AML riskini azaltmış ancak doza bağımlı toksisite olarak doksorubisin ilişkili kardiyomiopati, bleomisin ilişkili pulmoner fibrozis önemlidir.²⁶⁴⁻²⁶⁶

2.13.1. Erken Evre Olumlu Prognostik Faktörlü Hastaların Tedavisi (IA, IIA)

Erken Evre HL tedavisi için; kombine KT+RT en iyi tedavi seçimidir.^{267,268} ABVD rejimi, 2 siklus, standart rejim olarak kabul edilmektedir ve 20 Gy, tutulmuş alan involved field (IF) RT, standart tedavi olarak kabul edilmektedir. Erken evre I ve

IIA HL olgularında çeşitli KT rejimleri ile kombine RT uygulamaları ve tek başına RT sonuçları karşılaştırılmış ve sonuç olarak kombine tedavi yaklaşımlarının tek başına RT'ye üstün olduğu gösterilmiştir.²⁶⁹ Benzer şekilde erken evre olumlu prognostik HL hastalarında VAPEC-B (Vinkristin;doksorubisin; prednizon; etoposid; siklofosfamid; bleomisin) ve Stanford V rejimleri kullanılan çalışmalarda da kombine tedavinin tek başına RT'ye üstün olduğu gösterilmiştir.^{270,271} GHSG HD10 çalışmasında a- 2 kür ABVD sonrası 30 Gy tutulmuş alan RT'si, b-2 kür ABVD sonrası 20 Gy tutulmuş alan RT'si, c-4 kür ABVD sonrası 30 Gy tutulmuş alan RT'si ve d-4 kür ABVD sonrası 20 Gy tutulmuş alan RT'si kolları karşılaştırılmıştır.²⁷² Bu çalışmada tutulmuş alan RT dozları veya KT siklus sayıları arasında yanıt oranları ve sağkalım açısından fark bulunamamıştır. *The National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) kılavuzunda 20-30 Gy tutulmuş alan RT'si ve öncesinde 2-4 kür ABVD veya Stanford-V 8 hafta KT'si erken evre olumlu prognostik HL olgularında standart rejim (kategori 1) olarak kabul edilmektedir. Tek başına ABVD ise kategori 2B olarak önerilmiştir. Erken evre olumlu prognostik faktörlü HL olgularında kombine tedavi yaklaşımının bir parçası olarak farklı şekilde RT uygulamaları yapılabilmektedir. Genişletilmiş alan, tutulmuş alan veya sadece tutulmuş lenf noduna uygulanan RT sonuçlarının değerlendirildiği bir yeni çalışmada, tutulmuş lenf noduna yönelik uygulanan RT'nin 5 yıllık genel ve progresyonsuz sağkalım oranları, genişletilmiş veya tutulmuş alan RT uygulamaları ile benzer bulunmuştur.²⁷³ Bu çalışmada lokal ve uzak relaps oranları da 3 farklı RT yöntemi ile benzer bulunmuştur.

2.13.2. Erken Evre Olumsuz Prognostik Faktörlü Hastaların Tedavisi (IA, IIA)

Bu grup hasta için EORTC H6U çalışmasında 3 kür KT (MOPP vs ABVD) sonrası 35 Gy *mantle* tipi RT ve sonrasında 3 kür daha KT uygulanmıştır.²⁷⁴ 10 Yıllık sağkalım oranları her iki KT kolunda % 87 olarak bulunmuştur. Ancak bu çalışmada tedavi başarısızlığı riski MOPP kolunda % 24 iken ABVD kolunda % 12 olarak bulunmuştur. EORTC H9U ve GHSG HD11 çalışmaları 4 kür ABVD ve 4 kür BEACOPP tedavileri ile birlikte 20 veya 30 Gy tutulmuş alan RT'sini karşılaştırmak için, ECOG 2496 çalışması ise 6 kür ABVD ile 12 hafta Stanford V ve sonrasında RT kollarını karşılaştırmak için planlanmıştır.²⁷⁵

Erken evre olumsuz prognostik faktörlü HL olgularında KT ile kombine edilen farklı dozlardaki (20 Gy, 30 Gy ve 40 Gy) RT uygulamalarının karşılaştırıldığı çalışmalarda, düşük doz RT sonuçlarının yüksek doz RT kadar etkin olduğu gösterilmiştir.²⁷⁶ HD8 çalışmasında 2 kür dönüşümlü Siklofosfamid- Vinkristin-Prokarbazin-Prednizon (COPP/ABVD) rejimi sonrası genişletilmiş veya tutulmuş alan RT'si kolları karşılaştırılmış ve her iki kolda genel sağkalım ve *freedom from treatment failure* (FFTF) oranları benzer bulunmuştur.²⁷⁷ Aynı zamanda her iki kol arasında tam remisyon, relaps, progresyon, ikincil kanser ve ölüm oranları da benzer bulunmuştur. Akut yan etkiler ise genişletilmiş alan RT'si kolunda daha yüksek olarak kaydedilmiştir. Bu çalışmaların ışığında, erken evre olumsuz prognostik faktörlü hastalığın standart tedavisi olarak tutulmuş alan RT'si ile birlikte 4 siklus KT uygulanması kabul görmüştür. ABVD rejiminin etkinlik açısından daha yoğun bir rejim olan Bleomisin-Etoposide-Doksorubicin-Siklofosfamid-Vincristin-Prokarbazin-Prednizon (BEACOPP) gibi rejimlerle benzer etkinlikte olduğu, ancak yan etki yönünden daha avantajlı olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, EORTC H8U çalışmasında MOPP/ABV rejimi ile kombine olarak tutulmuş alan veya subtotal nodal ışınlama kullanılmış ve gruplar arasında fark bulunamamıştır.²⁷⁸ NCCN kılavuzunda ise 4-6 kür ABVD veya Stanford-V 12 hafta ve tutulmuş alan RT'si önerilmiştir.

2.13.3. İleri Evre Hastaların Tedavisi

İleri evre HL tedavisi için; İleri evre hastalık ile; B semptomlarının varlığı, 'Bulky' hastalık veya evre III veya IV hastalar kastedilmektedir. ABVD rejiminin etkili ve en az toksisiteye sahip ileri evre HL'da kullanılması gereken standart tedavi protokolü olduğunu göstermiştir.²⁷⁹ ABVD ve MOPP hibrid rejimleri ardışık tedavi rejimleri ile karşılaştırıldığında, MOPP/ABV hibrid rejimi ile MOPP/ABVD ardışık rejimlerinin tedavi sonuçları benzer bulunmakla birlikte, hibrid rejimin daha toksik olduğu ortaya konmuştur.²⁸⁰ Daha sonra ABVD rejimi ile MOPP/ABV hibrid rejimleri karşılaştırılmış ve hibrid tedavi şeması ile ABVD rejimine benzer sağkalım sonuçları elde edilmesine rağmen, hibrid tedavi şemasının ABVD'den daha toksik olduğu gösterilmiştir.²⁸¹ Tüm bu çalışmalardan elde edilen veriler doğrultusunda, ABVD KT şeması ileri evre hasta HL olgularında standart olarak kabul edilmiştir.

Yeni bir tedavi protokolü olarak 12 hafta süreyle uygulanan ve 7 farklı ilaçtan oluşan Stanford V rejimi kullanımı önerilmiştir. Bu protokolde KT sonrasında RT de yer almaktadır. Ancak, Stanford V protokolü uygulanan çalışmalarda elde edilen sonuçların, ABVD ve meklorethamin, vinkristin, prokarbazin, prednison, epidoksorubisin, bleomisin, vinblastin, lomustin, doksorubisin, and vindesin (MOPP-EBV-CAD) rejimlerinden daha kötü olduğu gözlenmiştir.²⁸² Farklı yeni tedavi rejimleri içeren şemalar kullanılmasına rağmen, günümüzde henüz hiçbir tedavi şeması ABVD tedavi rejiminin yerini alabilmiş değildir. İleri evre HL olgularında doz intens ve doz yoğun tedavi rejimlerini karşılaştıran çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin BEACOPP ve arttırılmış doz BEACOPP rejimi ile COPP/ABVD rejimleri karşılaştırılmış ve arttırılmış doz BEACOPP tedavi sonuçları diğer tedavi kollarından daha üstün bulunmuştur.²⁸³ Bu çalışmada beşinci yılda tüm ölüm oranları arttırılmış BEACOPP kolunda daha düşük, ancak beklendiği şekilde hematolojik ve diğer yan etkiler daha yüksek bulunmuştur. Her iki BEACOPP rejimi ile elde edilen sonuçların COPP/ABVD rejimine göre tüm prognostik gruplarda daha üstün olduğu ve bu sonuçlara dayanılarak BEACOPP tedavi rejiminin IPS'e göre 4-7 kötü prognostik faktörü olan ileri evre HL olgularında kullanılması tavsiye edilmektedir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, 4 ila 8 kür BEACOPP rejimleri karşılaştırılmış ve her iki kol arasında belirgin bir farklılık izlenmemiştir.²⁸⁴ Özetle, BEACOPP rejimleri ile elde edilen tedavi sonuçları oldukça ümit vericidir. Bu tedavi rejimi, kötü prognozlu olabilecek ileri evre HL olgularında daha başarılı tedavi sonuçları nedeniyle tercih edilebilir. Günümüze kadar yapılan çalışmalar, ileri evre HL hastalığına yaklaşımda tedaviye RT eklenmesinin ek bir katkı sağlamadığını göstermektedir.²⁸³⁻²⁸⁵ Sadece PET pozitif rezidü tümör bölgesine veya bulky kitleye RT uygulaması yararlı olmaktadır. NCCN, 6 kür ABVD veya Stanford-V 12 hafta (IPS < 3 olan seçilmiş vakalar) veya arttırılmış doz BEACOPP KT'sini (IPS ≥ 4 olan seçilmiş vakalar) ileri evre HL olgularında önermektedir.

2.13.4. Relaps Refrakter Hastalık Tedavisi

Tedavi ile HL olgularında yüksek oranda kür sağlanmasına rağmen, olguların yaklaşık % 5-10'u başlangıç tedavisine yanıt vermemektedir, yani refrakter hastalıktır. Relaps HL ise tedavi ile tam remisyon elde edilen olguların %10-30'unda izlenmektedir. Relaps olgusu, hem erken hem de ileri evredeki tüm HL olguları için en

önemli problem olmaya devam etmektedir. Relaps hastalık sıklıkla 1 ila 5 yıl arasında izlenmekte iken, 10 yıldan sonra relaps geliştiren olgular da rapor edilmiştir.^{286,287} Relaps şüphesi olan tüm olgularda başlangıç tanısı işlemleri yeniden yapılmalıdır. Başlangıç tedavisine rağmen refrakter veya relaps gelişen hastalara uygulanacak çok sayıda tedavi seçeneği vardır. Başlangıç tedavisi olarak RT verilen erken evre HL olguları, hastalık tekrarı halinde sistemik KT uygulamaları ile tedavi edilebilmektedir. Relaps sonrası uygulanan KT rejimleri ile elde edilen sağkalım oranları, çoğu kez başlangıçta KT ile tedavi edilen olgulardaki sağkalım oranlarından farklı değildir. Bu grup hastalarda KT ile 10 yıllık sağkalım oranı % 57 ila % 89 arasında değişmekle birlikte, bu oran ABVD verilen hastalarda belirgin olarak daha yüksek bulunmuştur. Başlangıç tedavisi olarak KT verilen hastalarda relaps görülmesi durumunda kullanılacak tedaviler arasında kurtarıcı (salvage) RT, kurtarıcı KT ve yüksek doz KT sonrası otolog veya allojenik kök hücre nakli sıralanabilir.

Sistemik tedavi sonrası relaps olan olgular 3 farklı kategoride değerlendirilebilir:

- 1- Tedavi ile hiç remisyona girmeyen hastalar,
- 2- Tedavi sonrası 12 ay içerisinde relaps geliştirenler,
- 3- Tedavi sonrası 12 aydan daha geç dönemde relaps geliştiren olgular.

Birinci gruptaki olgularda prognoz diğer grupta yer alan olgulara oranla daha kötüdür. 20 Yıllık sağkalım relapsın erken görüldüğü olgularda % 11 iken, relapsın geç görüldüğü olgularda bu oran % 22 olarak bulunmuştur.²⁸⁸ Başlangıç tedavisi tamamlandıktan sonraki 12 aydan daha geç dönemde relaps gelişen olgularda, ilk kullanılan tedavi rejimi ile tedaviye başlanılabilir. Oysa 12 aydan daha kısa sürede relaps geliştiren veya başlangıç tedavisine hiç yanıt alınamayan olgularda daha agresif tedavi rejimleri seçilmelidir. Ancak günümüzde birçok merkez, relaps olgularının tedavisinde yüksek doz KT (YDKT) ve bu tedaviyi takiben periferik kök hücre nakli (PKHN) uygulamasını tercih etmektedirler. Bununla birlikte, seçilmiş relaps olgularında kurtarıcı tedavi olarak RT'nin de tercih edilebileceği unutulmamalıdır.

Primer progresif hastalık, tedaviye rağmen yanıt alınamayan veya tedavi sonrası ilk 90 gün içinde progresyon gösteren hastalar için kullanılan bir terimdir. Bu hastaların çoğunda konvansiyonel kurtarıcı tedavi rejimleri ile yanıt oranı oldukça düşüktür ve 8 yıllık sağkalım oranı % 0-8 arasında değişmektedir.^{288,289} Bu olgularda erken dönemde YDKT ve sonrasında PKHN planlanmalıdır.²⁹⁰ Relaps gelişen olgularda YDKT

uygulaması ile 5 yıllık sağkalım oranı klasik KT rejimlerine oranla anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur. GHSG çalışmalarında 5 yıllık sağkalım oranı sadece tedavi verilen hastalarda % 33 iken, yüksek dozla birlikte otolog PKHN yapıldığında bu oran % 48'dir. Çok değişkenli analiz sonuçları, bu olgularda 50 yaş üzeri ve düşük performans skorunun kötü bir prognostik faktör olduğunu göstermektedir.²⁹¹ Başlangıç tedavisi sonrası 12 aydan daha geç dönemde relaps olan olguların % 80'inden fazlasında tam remisyon sağlanabilmektedir. Bu grup hastalarda medyan sağkalım 4 yıl civarındadır.²⁸⁸ Ancak tedavi sonrası ilk 1 yıl içinde relaps geliştiren olgular için bu oran daha düşüktür. Bu tür olgularda MOPP, ABVD veya bu iki rejimin kombinasyonunun kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır.²⁹²⁻²⁹⁴ Farklı kurtarma KT rejimlerini karşılaştıran bir çalışma henüz yoktur. Günümüzde remisyon sonrası relaps gelişen olgular için ilk planda YDKT düşünülmelidir. Yapılan çalışmalarda konvansiyonel KT rejimleri ile karşılaştırıldığında YDKT sonrası otolog PKHN rejiminin daha üstün olduğu ortaya konmuştur.^{295,296} Üç yıllık olaysız sağkalım oranı % 50'nin üzerindedir. Relaps olan hastalarda vinorelbinin birinci veya ikinci basamakta etkin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.²⁹⁷ Ayrıca bir primidin analogu olan gemitabin ile yapılan çalışmalarda da yüz güldürücü sonuçlar elde edilmiştir.²⁹⁸ Son dönemde yapılan çalışmaların sonuçlarına göre CD20 antijenine karşı geliştirilen monoklonal kimerik antikör rituksimab NLP HL olgularında yararlı olabilmektedir.^{299,300} Bu tedavi ile bazı klasik HL'lı olgularda da uzun süreli remisyon elde etmek mümkün olabilmektedir.

2.13.5. Noduler Lenfosit Predominant Hodgkin Lenfoma Tedavisi

Standart tedavinin yan etkilerinden kaçınmak için erken evre olumlu prognostik faktör NLP HL olgularında genişletilmiş veya tutulmuş alan RT'si, kombine KT protokolleri ve son dönemlerde monoklonal antikör tedavileri uygulanabilmektedir.²⁹⁹⁻³⁰² Yapılan bir çalışmada evre IA hastalarda sadece tutulmuş alan RT'si ile 5 yıllık sağkalım oranı % 95, relapssız sağkalım oranı ise % 100 olarak bulunmuştur.³⁰² Çok olumlu ve olumlu prognostik faktörlü NLP HL olgularında tek başına RT veya KT (MOPP) ve sonrasında RT sonuçlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada her iki tedavi kolunda genel ve relapssız sağkalım oranları benzer bulunmuştur.³⁰³ EORTC ve GHSG, günümüzde evre I-IIA NLP HL olgularının tutulmuş alan RT'si (30 Gy) ile tedavi

edilmesini önermektedir. Son zamanlarda rituksimab NLP HL'lı olguların birinci basamak tedavisinde veya relaps sonrasında kullanılmaya başlanmış ve olguların % 80'inde sadece rituksimab tedavisi ile tam veya parsiyel remisyon elde edilmiştir. Erken evre olumsuz prognostik faktörlü NLP HL ve ileri evre NLP HL olgularında uygulanması önerilen tedavi, klasik HL tedavisinden farklı değildir. NCCN ise IA-IIA'da tutulu alan RT, IB ve IIB'de KT ve RT veya Rituximab ile beraber KT ve RT'yi önerir.

2.14. Tümör İlişkili Antijenler

Allojenik Kök Hücre transplantasyonundan sonra rezidüel lösemi hücrelerinin elimine edilmesi veya azalması için kullanılmış olan Donör Lenfosit İnfüzyonu, lösemik hücrelere karşı T lenfosit eyleminin yani immunterapinin güçlü bir kanıtıdır. Bunun için kritik nokta immun sistem tarafından spesifik olarak tanınan immunojenik bir antijenin tanımlanmasıdır. Bunun için Tümör İlişkili Antijen (TİA) tanımı ilk kez Renal Hücreli Kanserde ve Malign Melanomda yapılmıştır. Bu TİA'lerin en önemli grubunu Kanser Testis Antijenleri (KTA) oluşturur. Major histocompatibility complex (MHC) Klas1 molekülü eksprese etmeyen dokularda eksprese olan bu antijenlerden bir kısmı hematolojik (HAGE), bir kısmı solid tümörler (GAGE1-2-8), bir kısmı da her ikisinde (BAGE) eksprese olmaktadır.³⁰⁴

KTA'ler kanserli hastaların spesifik immunterapisi için, normal dokuda sınırlı eksprese olması ve in vivo immunogenetik özellikleri nedeniyle uygun terapötik hedeflerdir.³⁰⁵ İdeal bir tümör antijeni tümör hücrelerinde stabil bir şekilde eksprese olan fakat normal dokularda eksprese olmayan ve tümör hücrelerinin yaşamının devamı için önemli veya kritik olan, spesifik proteinlerdir. Ne yazık ki bazı viral ilişkili tümör antijenleri dışında bu karakterde antijenlerin çoğu oto-antijendir. Oto antijenler genelde zayıf antijenlerdir, bunun timik negatif seleksiyon nedeniyle olduğu sanılmaktadır. KTA immun korunmuş bir alandan eksprese oldukları için bir avantajı var olarak görülmektedir. Testis, 2 nedenden dolayı bağışıklık sisteminden ayrıcalıklı görünür. Biri germ hücre yüzeylerinde HLA sınıf 1 ekspresyonunun olmaması, diğeri kan testis bariyeri nedeniyle immun hücreler ve farklılaşmış germ hücreleri arasında kontak inhibisyonudur.³⁰⁶

KTA kanser hücrelerinde anormal eksprese olan normal testiküler proteinlerdir. İlk başta sadece testise spesifik olduğu düşünülmüş fakat ileri çalışmalar ve özellikle RT-PCR çalışmaları ile normal bazı dokularda da zayıf ekspresyonu gösterdikleri anlaşılmıştır. KTA'leri X kromozomu ile kodlananlar (KT-X antijen) ve X kromozomu dışında kodlananlar (non X-KT antijen) olarak iki gruba ayrılır. X kromozomu üzerindeki yaklaşık bu kromozomun % 10'unu kapsar, non X-KT antijenleri ise tüm genom boyunca dağılmıştır. KTA germ hücre farklılaşmasının farklı evrelerinde eksprese olur. KT-X geni spermatogonia evresinde, non X-KT geni ise spermatosit gibi germ hücre farklılaşmasının geç evrelerinde eksprese olur. KTA çoğu kan testis alanının korunmamış alanında lokalize spermatogonia ve spermatositlerde lokalize seminiferöz epitelin bazal bölmesinde eksprese olmuştur³⁰⁷.

Bugüne kadar tanımlanmış KTA; MAGE-A, BAGE, HAGE, GAGE1, SSX, NY-ESO-1, SCP1, MAGE C1, SPANX, SP17, PASDI, SLLP1, PRAME, SEMG'den oluşmaktadır. Bu antijenlerin çoğu olumsuz prognozu yansıtır. Özellikle malign melanomda bu çalışmalar yoğunlaşmıştır. KTA malign melanom gibi malign hastalıkların progresyonunda yüksek sıklıkta eksprese olurlar ve ekspresyonla kötü prognoz ilişkilidir.

Bu antijenlerin ekspresyonu aynı bireyin tümör örneklerinde bile heterojendir. Bu durum başarılı bir immunoterapi için major bir engel olarak görülmektedir.³⁰⁶ Bu heterojenite bu genlerin promotor bölgesinin CpG dinükleotidlerinin metilasyon durumu ile koreledir.³⁰⁵ KTA regülasyonuna bakıldığında bu antijenlerin gen promotor bölgelerinde demetilasyonun bu antijenlerin ekspresyonunu arttırdığını göstermektedir. Bu ekspresyon artışı heterojeniteyi azaltacaktır. Bununla ilgili olarak 5-Aza 2 Deoksisitidin ile hipometilasyon sağlamak mümkündür.³⁰⁶

Sitotoksik T Lenfositler (STL) ile tanınan melanoma ilişkili antijenler 3 ana grupta toplanır.

1- Tümör ile ilişkili Testis Spesifik Antijenler (MAGE, BAGE, GAGE, PRAME)

2- Melanosit Farklılaşma Antijenleri (Tyrosinase, Melan-A/MART-1, gp 100, TRP-1ve TRP-2)

3- Mutant ve Aberan eksprese olan antijenler (MUM-1, CDK4, β -catenin, gp-100-in4, p15 ve N asetil glukozamintransferaz V)

Farklılaşma Antijenlerine karşı güçlü immun cevap gelişmesi, kendi antijenik yapılarına karşı tolerans nedeniyle sınırlıdır. Oysa Testis antijenlerinin yüksek immunolojik antijen olma potansiyeli vardır.³⁰⁸

Genel olarak tümör antijenleri, ekspresyon paternleri ve altta yatan gen mutasyon varlığı baz alınarak değişik gruplar altında incelenebilir. Mutasyonlar, translokasyonlar ve diğer genetik olaylara bağlı malign hücrelerin spesifik ürünleri olabilirler (örn; lösemideki füzyon proteini BCR/ABL, AML M3’de PML-RAR α), ikinci olarak, tümör hücreleri normal hücre sel bileşenlerinden daha yüksek düzeyde proto-onkogenlerin agresif tiplerini eksprese edebilirler (örn; meme kanserlerinde HER-2/neu amplifikasyonu), üçüncü olarak, tümör antijenleri içinde testis ve fetal dokular hariç normal dokularda eksprese edilmeyen genlerin, tümör hücrelerine sınırlı olduğu, mutant olmayan genlerin eksprese olduğu antijenler olarak görülebilirler. Bunlar kanser testis antijen ailesidir.³⁰⁸ PRAME kanser testis antijeni denilen MAGE, GAGE/PAGE, BAGE, LAGE/NYESO-1, Sperm protein 17³²⁹ denilen ailenin bir üyesidir ve bunların aksine lösemilerde özellikle de AML’de eksprese edilir. Kanser testis antijenleri, testis ve fetal dokular hariç normal dokularda eksprese edilmeyen ve genel olarak tümör hücrelerine sınırlı olduğu genel olarak kabul edilen bir gen ailesidir. Bu gen ailesinin üyelerinin genel olarak kanser immunoterapisinde ve tümör immunolojisinde önemli rolleri olduğu bilinir ve ilgi çeken alanların başında gelir.

2.15. PRAME Tanımı ve Görülme Sıklığı

PRAME; Preferentially expressed antigen of melanoma’nın kısaltması olarak bilinir. PRAME’i kodlayan gen Ikeda ve ark. tarafından rekürrent melanomalı hastada immun sürveyans çalışması esnasında bulunmuştur.³⁰⁸ İlk kez melanoma olgusunda yüzey antijenine karşı otolog sitotoksik T lenfositleri tarafından tanınan tümör ilişkili antijen olarak tanımlanmış ve tümör immunoterapisi için umut verici olduğu görülmüştür.³⁰⁸⁻³¹⁰

İlk kez 1988’de LB33 hastasından metastatik melanom lezyonundan MEL.A melanom hücre dizisi oluşturuldu. MEL.A hücreleri HLA sınıf 1 molekülleriyle otolog STL tarafından tanınan birçok antijeni eksprese etmekteydi. 1990 yılında hastadan toplanan Lenfositlerde anti tümör STL prekürsörlerinin sıklığını araştırırken bu STL klonlarına dirençli olan, otolog STL tarafından MEL.A hücreleri üzerinde tanınan en az

5 farklı antijen gösterildi. Bu antijenler HLA A28, B13, B44, Cw6 ile sunulmuştu. 1989 ile 1993 arasında hastalıksız nüksü olmayan hastalardan MEL.B hücre dizisi elde edildi. 1993’de HLA-A24 haricinde sınıf 1 moleküllerinde ekspresyon kaybı olan MEL.B melanom hücre dizisi oluşturuldu. Bu birkaç HLA molekülü kaybına sahip melanoma hücrelerinde STL klonu ile tanınan yeni bir tümör antijeni tanımlandı ve adına PRAME dendi. MEL.B’nin otolog STL uyarmasıyla HLA-A24 sınırlı bir STL klonu oluştu. Sürpriz bir şekilde bu klon PRAME genini eksprese etse de MEL.A dizisi için başarısızdı. Bu, STL klonunun Natural Killer İnhibitör Reseptör (HLA Cw7 molekülü ile etkileşime dayalı litik aktivite inhibisyonu) eksprese etmesine bağlandı. HLA Cw7 molekülü MEL.A hücrelerinde varken MEL.B hücrelerinde yoktu. MAGE genlerinin aksine PRAME testisten başka bazı normal dokularda da eksprese olur. Normal dokularda ekspresyonu melanoma hücrelerinde bulunanın % 3-5’den daha azdır.³⁰⁸

PRAME kodlayan gen 22.kromozonda (22q11.22) bulunur ve 509 aminoasitlik bir proteini kodlar.^{309,311} PRAME’in lokalize olduğu yer Lambda gen lokusu içindedir.³¹² Fizyolojik koşullarda fonksiyonunun ne olduğu bilinmeyen PRAME, normal dokularda oldukça düşük ekspresyon göstermektedir. PRAME Hücre membranı ve sitoplazmada eksprese olur.³¹³ Normal testiste görece daha yüksek oranda eksprese olurken çok daha az seviyede over, endometriyum, plesenta, adrenal bezler ve beyinde saptanabilir. Ancak bu dokularda sitotoksik T hücreleri tarafından tanınacak kadar yeterli PRAME peptid bulunmaz.^{308,314} Sağlıklı kişilerden alınan CD34 (+) kök hücrelerde ve genel olarak sağlıklı kişilerden alınan kemik iliği ve periferik kan örneklerinde PRAME saptanmamıştır³¹⁵⁻³¹⁷ veya tümör örneklerinin yanında ihmal edilebilir düzeyde bulunmuştur veya zayıf pozitiflik saptanmıştır.³¹⁸ Bu bulgunun aleyhine bir çalışmada, örneklerde kemik iliğinde en yüksek PRAME ekspresyonu $2,5 \times 10^{-5}$ bulunmuştur. CD34 (+) kök hücrelerdeki PRAME ise bundan 10 kat fazla bulunmuştur.³¹⁹ Paydaş ve ark. tarafından yapılan akut lösemili 74 vakada PRAME ekspresyonunun değerlendirildiği ve 30 kontrol hastası ile karşılaştırıldığı çalışmada 19 vakada PRAME ekspresyonu saptanmıştır. Bu çalışmada sadece 2 kontrol vakasında çok zayıf ekspresyon tespit edilmiştir.³²⁰

PRAME, çeşitli solid tümörlerde eksprese olmaktadır. Melanoma dışında küçük hücreli dışı akciğer kanseri, baş-boyun yassı hücreli karsinomlar, sarkomlar, renal karsinom, meme karsinomu, noroblastoma, wilm’s tümöründe³²¹ ve medullablastoma

gibi solid tümörlerde, hemopoetik neoplazilerden akut miyeloblastik ve lenfoblastik lösemilerde, kronik miyelositik lösemide, kronik lenfoproliferatif hastalıklarda, lenfomalarda ve multipl miyelomada da yüksek seviyelerde PRAME ekspresyonu gösterilmiştir.^{310,322} Sıklık olarak değerlendirildiğinde, PRAME ekspresyon prevelansı melanomlarda çok yüksek olup, primer lezyonlarda % 88, melanom metastazlarında % 95 eksprese olmaktadır.³⁰⁸ Melanomaların farklı evrelerindeki, farklı PRAME ekspresyonu göstermiştir ki, PRAME primer melanomalarda eksprese olmakta ancak normal deri dokusu ve benign melanositik lezyonlarda (nevus veya mole) eksprese olmamaktadır. Bu da PRAME ekspresyonunun melanositik transformasyon esnasında oluştuğunu düşündürmektedir.³²³ Sarkomlarda % 39-80, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde % 46-78, renal hücreli kanserde % 40, baş-boyun tümörlerinde % 29-39, meme kanserinde % 27 oranında, nöroblastomada (% 93) ve medulloblastomada yüksek oranda eksprese olduğu saptanmıştır.^{308, 324-327} Başka bir çalışmada ise meme kanserli dokuda % 53, normal meme dokusunda ise % 37 oranında PRAME mRNA'sı bulunmuştur.³²⁸ Akut lösemide % 33 (AML M3 % 75, Akut Lenfositik Lösemi(ALL) % 64, Kronik myelositik Lösemi (KML) BC % 50 ve AML M2 % 45), Paydaş ve ark. RT-PCR ile PRAME ekspresyonunu AML'de % 30, ALL'de % 17, KML'de % 34, Kronik Lenfositik Lösemi'de (KLL) % 33 tespit etmiştir.^{309,320}

2.16. PRAME Fonksiyonu

PRAME'in fonksiyonu net olarak tanımlanmasa da; PRAME etkisini, retinoik asit (RA) tarafından uyarılan diferansiasyon, büyümenin arresti ve apoptozisi bloke ederek gösterir.^{322,330,331} Retinoik asid reseptör (RAR) sinyalinin dominant baskılayıcısı olduğu saptanmıştır.^{330,331} RAR sinyal defektleri kanserden sorumlu tutulmuştur. Epping ve ark. RA mevcudiyetinde RA reseptörlerine PRAME bağlanması ile hedef genlerin transkripsiyonu ve ligand indüklediği reseptör aktivasyonu engellendiğini saptadılar. Bunun siklin bağımlı kinaz inhibitörü (CDKN1A, diğer adı p21) ve Retinoik Asid Reseptör Beta (RAR β) down regülasyonu ile yapıldığını belirttiler. İlginç olarak p21 hem proapoptotik hem antiapoptotik özellik göstermektedir. RAR- α 'nın translokasyonu (fonksiyonu değişmiş reseptörlere neden olur) Akut Promyelositik Lösemide, RAR- β 'nın kaybı meme ve akciğer kanser gibi solid tümör progresyonuna neden olur. Bu bağlamda PRAME nükleer reseptör sinyalizasyonunun modülasyonu

olabilir fakat nükleer reseptörlerinde hepsinin inhibitörüdür denilemez. PRAME'in baskılanması RA'e duyarlılığı geri getirir. PRAME aşırı ekspresyonu ile tümör hücrelerinin tümör supresör RAR sinyalizasyonundan kaçabildiği saptanmıştır. RAR sinyalini antagonize ederek kanser hücresine yaşam avantajı ve büyüme avantajı sağlamaktadır.³³⁰ Histon Deasetilaz İnhibitörleri (HDAI) malign hücrelerin selektif olarak proliferasyonunu inhibe eder ve kanser tedavisinde kullanılır. RA sinyalizasyonunu indükleyen HDAI ile tedavi RAR α ve PRAME genlerinin artmış ekspresyonu ile inhibe olur ve HDAI'nin indüklediği apoptozis ve büyümenin durmasına direnç gelişimine neden olur. HDAI gibi tedavilerin terapötik etkinliğini arttırmak için değişik stratejiler içinde PRAME'in ekspresyonunun baskılanması da vardır.³³² PRAME, Lösin zengin bir proteindir. % 21,8'i Lösin veya İzölösin'den oluşur. Lösin zengin tekrarlı proteinlerin tersiyer yapıları; proteinler, nukleik asitler, diğer ligandlarla etkileşim için ideal bir yapıdır. Bu bölgelerin hücre immunitesinde, hücre adezyonunda ve sinyal iletiminde önemli rolleri vardır.³³³

Lösemik hücrelerde apoptozis ile ilişkili proteinlerle ilgili gen ekspresyonunda azalmayla lösemik hücrelerin yaşam süresinin uzaması ve miyeloid farklılaşmasında inhibisyon bildirilmiştir.^{334,335} Tanaka ve ark. insan KML K562 hücre serisinde (Ph + hücre dizisi) PRAME'in RA yokluğunda bir siRNA aracılı olarak ekspresyonunun engellenmesinin hücre siklusunda arreste ve sonrasında lösemik hücre apoptozisine yol açtığını bulmuşlardır. Koloni farklılaşması ve şekillenmesi azalmış, aynı zamanda eritroid farklılaşmasının regülasyonunu sağlayan genlerin de (GATA-1, GATA-2, PU.1; GATA-1 PU.1'in transaktivasyonunu bloke olduğu, eritroid ve megakaryositer serinin maturasyonunun devamını sağladığı, GATA-2 hemopoetik gelişimin erken evrelerinde eritroid farklılaşmasının progresyonunu azalttığını) ekspresyonunu değiştirdiğini göstermişlerdir. Buna göre PRAME blokajı ile GATA-1 artması ve GATA-2 ve PU.1'in azalması ve eritroid farklılaşma gösterilmiştir. PRAME'in ekspresyonunun engellenmesi ile S fazındaki hücrelerin önemli oranda azaldığı, G0/G1 fazındaki hücrelerin arttığı gözlenmiş ve bununla beraber hücre proliferasyonunun ve koloni farklılaşma kabiliyetinin azaldığı saptanmıştır. G0/G1 fazındaki hücre siklus arresti p27'nin (hücre siklus arrestinde önemli bir rol oynar) artışı ile ilişkilidir. Hücre siklusunun durmasını apoptotik hücrelerin artması izledi (PRAME bloke edilen hücre topluluğunda yaklaşık % 12 apoptotik hücre artışı varken kontrol PRAME

bloklanmamış hücrede % 2). Hücre siklus arresti sonrasında Annexin V (protrombin ile fosfotidilserin bağlama bölgesi ile yarışır ve fosfolipaz A1'in aktivitesini inhibe ederek koagülasyonun inhibisyonunda rol oynayan bir molekül) artışı ve Caspase-3 (Apotoziste rol oynayan sistein-proteaz grubu bir enzim) aktivitesinde artma saptandı. Tanaka PRAME'in BCR-ABL'den kaynaklanan pro-survial sinyaller aracılı bir mekanizmayla BCR-ABL ile ilişkili olduğunu saptadı. Ayrıca PRAME ekspresyonunu klinik lösemik örneklerde tanıda ve relapsta karşılaştırdı. Relaps olduğunda PRAME ekspresyonunun arttığını buldular. Bu durum S fazındaki hücrelerin yüzdesinin artması ile önemli ölçüde ilişkili bulunmuştur. Bu gözlem ile PRAME ekspresyonu önemli ölçüde kötü genel sağkalımla ilişkili bulunmuştur.³³⁴ De Carvalho ve ark ise BCR-ABL aracılı PRAME aşırı ekspresyonunun KML hastalarında TRAIL (TNF related apotozis –inducing ligand) down regülasyonundan sorumlu olabileceğini saptadılar.³³⁶ Oehler ve ark. PRAME'in normal hemopoetik ve lösemik progenitör hücrelerde myeloid farklılaşmasını inhibe ettiğini gösterdiler.³³⁷ Bunların tersine Tajeddine ve arkadaşlarının çalışmasında kültüre edilmiş hücre serilerinde (CHO-K1 ve HELA) lösemik hücrelerde PRAME'in in- vivo tümör gelişimini azalttığı ve lösemik hücre serilerinde kaspaz bağımsız hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir.^{334,338}

PRAME çekirdek içinde sublokalize ve hücre proliferasyonunu inhibe ediyor görünmekte ve ayrıca PRAME'in lösemik hücrelerde stabil ekspresyonu bazı proteinlerin ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır. Bu proteinler; Heat-Shock proteini (Hsp27), Siklin bağımlı kinaz inhibitörü (p21), Kalsiyum bağlayan protein (S100A4)'dir. S100A4 yüksek seviyeleri bazı metalloproteinaz aktivesini regüle ederek tümörün anjiogenezine, büyümesine ve metastazına katkıları bilinmektedir. Hsp27'nin Meme, Over, Prostat, Endometriyal kanserlerde, Osteosarkomda ve Lösemide artmış seviyelerine bağlı olarak onkogenezis ve KT direnci ile ilişkisi bilinmekte ayrıca apoptozisi baskıladığı düşünülmektedir. p21 aslında tümör suprese edicidir. Fakat AML'de p21 ekspresyonu KT direnci ve bağımsız olumsuz prognostik faktörle korele görülmektedir. Apoptozisi inhibe ettiği ve kanserlerin bir grubunda olumsuz prognozla ilişkili olduğu bilinen bu üç proteinin PRAME ile ekspresyonunun azalması akut lösemide PRAME'in prognozu iyileştirdiğini sonucuna katkıda bulunur.³³⁸

PRAME'in bu fonksiyonları her çalışmada gösterilemedi. Steinbach ve ark. PRAME'in RA sinyalizasyonunu baskılama veya HspB1 ve S100A4 downregülasyonu

ile kaspaz bağımsız apoptozisi indüklemeye fonksiyonunu, yüksek PRAME ekspresyonu olan AML örneklerinde bu ilişkiyi gösteremedi. Bunu AML’de PRAME’in bilinen transkripsiyonel aktivitesini, diğer sinyal yolları vasıtasıyla büyük ölçüde etkisiz hale getirilmesi olarak yorumladı.³³⁹

Diğer bir çalışmada, aşırı PRAME eksprese eden lösemik hücrelerin apoptozis ilişkili proteinler için kodlanan genlerin ekspresyonunu azaltarak, lösemik hücrelerin yaşamasına ve ayrıca ABC taşıyıcılarının (tedavi sırasında kemoterapötiklerin dışarıya atılmasında görevli) gen ekspresyonunda artma ile ilişkili olarak çoklu ilaç rezistansı (MDR= multi drug rezistans) oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir.³⁴⁰ Lösemide bu çelişkili durumun tersine solid tümörlerde yüksek PRAME seviyeleri kötü klinik gidişle ilişkilidir.³⁴¹ Özellikle meme kanseri ve ileri evre nöroblastomada PRAME ekspresyonu ile kötü klinik gidiş arasında ilişki net olarak saptanmıştır.³³⁴

PRAME’in diğer bir kullanım alanı MRH izlenmesinde yararlı bir belirleyici olmasıdır. KT alan hastalarda PRAME eksprese eden lösemik hücrelerin azalması sonucunda özellikle pediatrik hastalarda MRH moniterizasyonunda da kullanılabilir.^{322,334} Özellikle lösemilerde RT-PCR ile kantitatif değerlendirme de MRH saptanması için iyi bir belirleyicidir.³⁰⁹

Diğer hemopetik neoplazilerde ve solid tümörlerde PRAME sıklığı ve fonksiyonları ile ilişkili çalışmalar olmasına karşın HL olgularında PRAME çok az sayıda olguda incelenmiştir. Martin S. Staeger ve arkadaşlarının yaptığı ve 4 HL hücre dizisi kullandığı bir çalışmada PRAME’in yalnızca rezistan HL’lı olgulara ait hücre serilerinde eksprese olduğu gösterilmiştir.³⁴² Aynı çalışmada tümör antijenlerinin ekspresyonu, kemo-rezistan HL’da ko-stimülatör moleküller ile HL hücrelerine karşı sitotoksik T hücre cevabı için hedef olabileceği de belirtilmiştir.³⁴¹ Klaus Willenbrock ve arkadaşlarının yaptığı ve 4 HL hücre dizisi (2’si NS, 2’si MS tip HL), 3 ABHL dizisi karşılaştırdığı çalışmada, PRAME ekspresyonu HL’da çok yüksek bulunmuştur. Buna göre 44 farklı gen HL’da, 34 farklı gen ABHL’da saptadı. CD40, CD54, CD80, Lenfotoksin A, IL-6 ve kemokin CCL17 (TARC) HL’da yüksek eksprese olurken, ALK ve CD45 ABHL’da daha fazla eksprese olduğu bulundu. HL’da en yüksek 110 kat ile CCL17/TARC olmak üzere PRAME için 33 kat yüksek bulundu.³⁴³ Schwering ve ark. Klasik HL Hodgkin RS Hücrelerinden köken alan L1366 hücre dizisinde RT-PCR ile PRAME’in de içinde bulunduğu bir takım HL spesifik genleri tanımladılar.³⁴⁴

2.17. PRAME Gen Regölasyonu

Diğer KTA gibi PRAME kemik iliğı ve diğer normal dokularda hipermetiledir, fakat malign hücrelerde genellikle hipometiledir. Schenk ve ark. PRAME geninin genelde eksprese olmadığı hücrelerde, artmış regölasyonu için PRAME regölütör bölgesinin tanımlanan kısmında metilasyon paterninde değışiklikleri gösterdiler. PRAME'in transkripsiyonel regölasyonunun direk veya indirek olarak DNA metilasyon gibi epigenetik mekanizmalara bağı olduğu gösterilmiştir. 5-Aza 2 Deoksitidin tedavisi (Sitozin metilasyonu ökaryotik genlerde DNA modifikasyonunda sıkıtır ve onkogeneizde ve gen aktivasyonunda kritik rol oynar) ile PRAME ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. PRAME (+) hücreler, PRAME (-) hücrelerden daha az 5 metil sitozin içermektedir. PRAME 5 bölgesindeki spesifik CpG alanlarının hipometilasyonu yüksek PRAME ekspresyonu ile ilişkilidir. Araştırcılar tesadüf olarak Histon Deasetilaz İnhibitörü olan Trichostatin A'nın (DNA'nın yoğunlaşmasında önemli olan histon asetilasyonunda artma yapan ajan) PRAME ekspresyonunu indüklediğini buldular.³²² Kronik faz KML ile karşılaştırıldığında blastik fazda PRAME demetilasyonu daha sık görölmektedir.³⁴⁵ Bu verilerle KML blastik krizde artan PRAME ekspresyonunu hedefleyen tedavi seçenekleri ilginç yaklaşımlardır

2.18. Hemopoetik Malignensilerde PRAME Sıklığı ve Takipte Önemi

Lösemiler içinde en yüksek PRAME ekspresyonu akut lösemilerde saptanmıştır: Farklı çalışmalarda AML'de bu oran % 30-62 arasında iken ALL'de % 15-65 arasında oldukça değışken oranlarda bulunmuştur.^{309,319,320,325,345} AML olgularında kapsanan olgu sayısına göre değışmekle birlikte PRAME ekspresyon oranları % 35 ile % 47 arasında saptanmıştır.³¹⁵⁻³¹⁷ Çocukluk yaş grubunda yapılan bir çalışmada ise bu oran % 62 kadar yüksek saptanmıştır.³¹⁹ AML'nin alt tiplerinde de PRAME ekspresyonları farklı bulunmuştur: AML M2 ve M3 alt tiplerinde daha yüksek oranda PRAME saptanmaktadır. Bununla ilgili çalışmalarda M2 ve M3 olgularda bu oran % 75'e kadar çıkmaktadır.^{315,317} AML-M2 ve t(8:21) olgularında daha yüksek PRAME ekspresyonu saptanması AML1-ETO füzyon geninin PRAME gen aktivasyonu ile ilişkili olabileceğini telkin etmektedir.³¹⁵ Bu durum ETO füzyon geni taşıyan olgularda PRAME'in hedef olabileceğini telkin edebilir.

Yetişkin ve çocuklarda görülen ALL olgularında PRAME gen ekspresyonu farklı oranlarda bulunmuştur. Çocukluk çağı ALL'lerde % 20 ile % 42'sinde PRAME ekspresyonu saptanırken,^{315,346} yetişkin ALL olgularında bir çalışmada % 64 PRAME ekspresyonu saptanmıştır.³¹⁷ Bir çalışmada ise ilginç olarak t(9:22) olan ALL'de PRAME oldukça yüksek düzeyde bulunurken (% 83), aynı çalışmada t(9:22) (-) olan olguların % 50'de saptanmıştır.³¹⁷ T-ALL ve B-ALL olgularında PRAME saptanma oranları da farklıdır. Steinbach PRAME sıklığını T-ALL için % 33, B-ALL'de % 48 saptamıştır.³⁴⁶ Watari, PRAME ekspresyonunun BCR/ABL rearanjmanı ile indüklenebileceğini göstermiştir, ancak bütün çalışmalarda bu sonuca varılamamıştır.^{317,347}

PRAME ile ilgili lenfoma ve kronik lösemilerle ilgili çalışmalar az vaka içermektedir ve bu olgularda da PRAME ekspresyonu oldukça değişkendir. Bir çalışmada KML'de % 31 oranında PRAME ekspresyonu saptanmıştır. Fazlarına göre bakıldığında, kronik fazda %23'ünde, akselere fazda % 29'unda ve blastik fazda % 42 oranında PRAME saptanmıştır. Bu bize KML progresyonu sırasında PRAME ekspresyonunun arttığını telkin etmektedir.³¹⁷ BCR/ABL füzyon gen transfeksiyonu ile lösemik hücre dizisinde PRAME indüklendiği söylene de KML olgularında PRAME ekspresyonunun yalnızca % 31 olması bu konudaki belirsizliği işaret etmektedir.^{317,318} KML'de kronik fazdan blastik faza geçişte PRAME seviyelerinde artma, lösemik blastik hücrelerin artımından önce gerçekleşmekte, bu yüzden PRAME'in blastik faza geçen KML hücrelerinin büyüme ve yaşama avantajı sağlayabileceği ve relapsta ortaya çıkan KML hücre popülasyonunun daha agresif karakteristiklerinden sorumlu olabileceği vurgulanmaktadır.³⁴⁸

KLL'de PRAME ekspresyonu % 0-28 arasında bulunmuştur.^{313,309,315,319,340,349} KLL ve lenfoproliferatif olgularda PRAME oranları çok daha fazla değişkendir. Bu oran % 15,8 olabildiği gibi van Baren'in çalışmasında olduğu gibi 5 KLL olgusun hiçbirinde PRAME saptanmayabilir.^{315,318} Lenfoid neoplazilere bakıldığında hasta sayıları az olmakla beraber prolenfositik lösemili 4 olgunun 2'sinde saptanırken, Mantle Hücreli Lenfomalı 16 olgunun 7'sinde PRAME saptanmıştır. PRAME, mantle hücreli lenfomada daha güçlü ve daha sık ekspresyon göstermekte ve bu özellik diğer lenfoproliferatif hastalıklardan ayırım için PRAME 'i daha faydalı bir belirteç yapmaktadır.^{335,350} van Baren'in serisinde 1 saçlı hücreli lösemide PRAME

saptanmamış, NHL'lı 20 olgunun 3'ünde, HL'lı 7 olgunun 1'inde PRAME saptanmıştır.³¹⁵ Matsushita ise 13 NHL'lı olgunun 3'ünde PRAME ekspresyonu saptamıştır.³¹⁷ Aslında değişik çalışmalarda bu oranların bu kadar fazla değişken olmasının bir diğer nedeni de farklı yöntemlerin kullanılmış olmasıdır. Arons ve ark. PRAME'i KLL ve saçlı hücreli lösemide (HCL) çalışmıştır. Konvansiyonel PCR ile 37 HCL'li hastanın % 8'i ve 22 KLL'li hastanın % 27'sinde PRAME pozitifken, kantitatif RT-PCR ile neredeyse tüm hastalar ve normal dokularda PRAME ekspresyonu saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda HCL ve KLL'nin aşırı PRAME ekspresyonunda farklılık gösterdiği ve normal bazal PRAME ekspresyonunun minimal rezidüel KLL ya da HCL'li hastaları takipte kullanılmasının uygun olmayacağı sonucuna varılmıştır.³⁵¹ Kantitatif flow-sitometrik analiz de bazı çalışmalarda özellikle kronik lenfoproliferatif hastalıklarda periferik kandaki lösemik hücrelerdeki PRAME ekspresyonunu saptamak için kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak 30 sağlıklı gönüllünün periferik kanı kullanıldığında kronik lenfoproliferatif hastalığı olanlarda % 90 PRAME (+) lenfosit saptanırken, normal örneklerin hiçbirinde % 20'den fazla PRAME (+) lenfosit saptanmamıştır.³¹³

Multipl myeloma hücre dizilerinde yapılan çalışmada 17 dizinin 11'inde oldukça yüksek PRAME gösterilmiştir.³⁵² van Baren'in serisinde 9 myelom olgusunun 2'sinde saptanırken Waldenström makroglobulinemili 1 olguda saptanmamıştır.³¹⁵ Evreye göre bakıldığında ileri evredeki multipl myelomalı hastalarda daha yüksek oranda PRAME saptanmıştır. Bir çalışmada erken evrede 11 multipl myelom olgusunda yüksek düzeyde PRAME saptanmazken evre III'de % 48'inde yüksek düzeyde PRAME saptanmıştır.³⁴⁹

Hemopoetik neoplazilerde değişken aşırı PRAME ekspresyonunun sebebi açık değildir. Bu durum PRAME'in promotor bölgesindeki DNA metilasyon paternine bağlı olabilir.³¹⁴ Diğer önemli bir sebep de PRAME ekspresyonunu saptamada ya da seviyesini ölçmede kullanılan metodların farklı duyarlılık ve nitelikte olmasıyla ilgili olabilir. Bu amaçla semikantitatif ve kantitatif metodlar kullanılmıştır. Normal periferik kan ve kemik iliği örneklerinde RT-PCR kullanılarak PRAME ekspresyonu saptanmış olsa da, bu durum özellikle immunoterapi açısından ve minimal rezidüel hastalık izleminde önemli bir problem teşkil etmemektedir. Çünkü normal dokularla kıyaslandığında tümör hücrelerinden 3 logaritma daha düşük bir ekspresyon vardır.^{351,314,353}

Geçici myeloproliferatif bozukluk Down sendromlularda, neonatal dönemde %10 civarında görülen ve spontan regrese olan fakat 2-4 yıl içinde vakaların % 20-30'nun progresyon ile Akut Megakaryoblastik Lösemi'ye dönüştüğü bilinmektedir. Bu geçici durum ile akut megakaryoblastik löseminin morfolojik ve immunofenotipik olarak benzemesi nedeniyle bu durumu irdelemek üzere gen ekspresyonları araştırılmıştır. Down sendromlularda akut megakaryoblastik lösemi'de yüksek oranda PRAME ekspresyonu saptanırken geçici miyeloproliferatif bozuklukta PRAME saptanmaz Bu yüzden PRAME Down sendromlu hastalarda Akut Megakaryoblastik Lösemi'de muhtemel progresyonla kendi kendine regresyon olan vakaları ayırım için ideal bir belirteçtir. Ayrıca Down sendromlularda akut megakaryoblastik lösemi'ye transformasyon için faydalı bir belirteç olabilir.³⁵⁴

AML'de çok sayıda TIA tanımlanmış ve bazılarının MRH moniterizasyonunda prediktif rol oynadığı gösterilmiş.³⁵⁵⁻³⁵⁸ Bu bilgiler ışığında PRAME, hemopoetik neoplazilerin azımsanmayacak kısmında eksprese olduğu için MRH monitorizasyonunda yararlı olabilir. PRAME'in çocukluk çağı AML'de MRH izlenmesinde yararlı olduğu, KT sonrasında önemli azalma saptandığı³¹⁷ ve çocukluk çağı ALL olgularında da relaps belirleyicisi olduğu,³⁴⁶ allogeneik kök hücre nakli sonrası da relapsı erken gösterebildiğini vurgulayan çalışmalar ve hatta klinik relapstan önce yüksek bulunduğunu ve relapsı önceden haber verdiğini gösteren çalışmalar vardır.³¹⁹ Kronik lenfoproliferatif hastalıklı 58 olgu ile yapılan çalışmada ise PRAME ile MRH izlenmesinin uygun olduğu belirlenmiştir. Özellikle mantle hücreli lenfomada daha da iyi bir gösterge olabilir.³¹⁸ Lösemilerde indüksiyon tedavileri ile PRAME önemli ölçüde düşmekte relapsta ise artmaktadır ve hatta morfolojik ve sitolojik relapsa öncelik edebilmektedir. Allotransplantasyon sonrası iyi bir izleme belirleyicisi olarak saptanmıştır.^{359,320} RT-PCR ile kantitatif PRAME ölçümünün Lösemilerde MRH takibinde uygun olduğu bulunmuştur.^{317,360} Qin ve ark. 204 yeni tanı almış AML hastasının kemik iliği örneklerinde RT-PCR ile WT₁ ve PRAME transkript düzeyine bakmışlar ve 21 hastayı ortalama 11 ay takip etmişlerdir. Kontrol grubu olarak kullandıkları 22 normal kemik iliği örneğinde düşük seviyede WT₁ ve PRAME ekspresyonunu göstermişlerdir. Hastalarda WT₁ % 79,2 ve PRAME % 55,4 bulunmuştur. WT₁ ve PRAME'in takip esnasında dinamik seyrinin, normal seviyenin üstüne çıkmasının veya zamanla yükselmesinin klinik relapsı düşündüreceği

saptanmıştır. Bu yüzden, WT₁ ve PRAME'in aynı anda belirlenmesi AML hastalarında minimal rezidüel hastalığı gösteren hassas bir moleküler belirteç özelliği sağlayabildiği ileri sürülmüştür.³⁶¹

2.19. Hemopoetik Neoplazilerde PRAME Ekspresyonunun Prognostik Önemi

PRAME ekspresyonu ile klinik ve laboratuvar bulguları arasındaki ilişkiler net değildir. Ancak en azından bazı çalışmalarda PRAME ekspresyonu olan AML'li çocuklarda, olmayanlara göre gerek hastalıksız sağkalım gerekse toplam sağkalımın daha uzun bulunması, tanı anındaki Beyaz Küre sayısının PRAME ile negatif olarak korelasyon göstermesi, PRAME pozitif lösemilerin KT'den sonra daha düşük relaps göstermesi, t(8:21) ve t(15:17) gibi iyi sitogenetik göstergeler saptanan olgularda PRAME yüksek saptanması gibi iyi prognoz belirleyicileri arasında ilişki gösterilmiştir.^{315,317,319,346} Tüm bunlar PRAME ekspresyonun özellikle çocukluk çağı AML olgularında olumlu prognoza işaret edebileceğini telkin etmektedir. Elli olgunun kapsandığı çocukluk çağı ALL'de de hastalıksız sağkalım, PRAME (+) olgularda daha yüksek, Beyaz Küre sayısı daha düşük bulunmuş ancak bunlar istatistiksel anlamlı saptanmamıştır. Yine bu seride PRAME ile yaş, cinsiyet, prednizon yanıtı, periferik kandaki blast oranı veya organomegali arasında korelasyon göstermemiştir.³⁴⁶

Kronik lenfoproliferatif hastalıklarda, PRAME ekspresyonu ile klinik ve laboratuvar bulguları arasında korelasyon saptanmamıştır. Ancak PRAME, agresif seyirli lenfoproliferatif hastalıklarda daha fazla saptanmıştır.³¹⁸ Multipl myeloma olgularında da agresif seyir ile PRAME paralelliği saptanmıştır.³⁴⁹ Bu durum PRAME ekspresyonunun en azından bazı hemopoetik neoplazilerde prognostik önemi olduğunu ve daha ileri çalışmalar yapılması gerektiğini vurgulamaktadır.

2.20. Solid Tümörlerde PRAME ve Ekspresyonunun Prognostik Önemi

RT-PCR ile primer nöroblastomaların % 93'ünde ve ileri evre nöroblastomaların % 100'ünde PRAME ekspresyonu saptamışlardır. PRAME ekspresyonunun nöroblastomada kötü prognoz ile ilişkili olduğu saptanmıştır.³⁶² Bu bulgular çocukluk çağının bu önemli hastalığı için PRAME'in iyi bir hedef olabileceğini telkin etmektedir.

Renal hücreli karsinomlarda (RCC) % 40 PRAME ekspresyonu saptanmıştır. Neumann ve ark. RCC'lerde T-hücre aracılı immunoterapik tedaviyi geliştirmek için, içinde PRAME'in de olduğu birtakım tümör ilişkili antijenlerin (RAGE-1, tirozinaz, MAGE-1, MAGE-2, NY-ESO-1, Melan-A/MART-1, glikoprotein (gp) 75, gp100, Beta-katenin ve MUM-1) mRNA ekspresyonunu araştırmışlardır. Çalışmayı 14 RCC hücre dizininde, 37 primer RCC doku spesmeninde, 2 RCC metastazında ve 33 normal renal epitel doku spesmeninde yapmışlardır. RCC hücre dizinlerinde en yüksek düzeyde PRAME (10/14) eksprese olduğunu bulmuşlardır (RAGE-1 (7/14) ve gp (4/14)). Hiçbir RCC hücre dizininde bu antijenler dışında antijen ekspresyonu (tirozinaz, Melan-A/MART-1, MAGE-1, MAGE-2, NY-ESO-1, gp100, Beta-katenin ve MUM-1) saptanmamıştır. 39 RCC doku örneğinde de, PRAME ekspresyonu diğerlerine göre daha yüksek (8'inde (% 21) RAGE-1, 15'inde (% 40) PRAME ve 4'ünde (% 11) gp75 mRNA) bulunmuştur.³²⁴

Over karsinomlarında Partheen ve ark. prognostik faktör olarak kullanılabilme ihtimali olan içlerinde PRAME olan 7 potansiyel belirleyicinin (CLU, ITGB3, TACC1, MUC5B, CAPG, PRAME ve TROAP) gen ve protein ekspresyonlarını araştırdı. 19 over karsinomunda kantitatif RT-PCR kullanılarak analiz edildi. Bir kısım belirleyicinin iyi prognozlu tümörlerde (CLU ve ITGB3), PRAME'in ise (CAPG de beraber) kötü prognozlu olanlarda daha fazla eksprese edildiğini gösterdi.³⁶³

Bankovic ve ark. PCR yöntemiyle, küçük hücreli olmayan akciğer kanserli 30 hasta ve normal akciğer dokusunda DNA haritasını karşılaştırarak genomik instabiliteyi araştırmışlardır. Sonuç olarak; küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin karsinogenezisinde PRAME'in (Beraberinde E2F4, PHACTR3 ve CDH12) önemli role sahip olduğunu yayınlamışlardır.³⁶⁴

Figuerido ve ark. baş-boyun kanserlerinde reverse-transkriptaz PCR kullanarak, tümör dokusunda, cerrahi sınırdaki, varsa tutulan lenf nodlarında içlerinde PRAME'in olduğu (MAGE-1, MAGE-4, MAGE-10, MAGE-12, B melanoma, LAGE, NY-ESO-1) antijenlerinin ekspresyonlarını semikantitatif olarak değerlendirmişlerdir. Bu çalışma, 15'i ağız içinde, 14'ü larinkste, 4'ü farinkste yerleşmiş skuamöz hücre karsinom tanılı yaşları 31-91 arasında (ortalama=56) değişen, 31'erkek ve 2'si kadın 33 hastada yürütülmüştür. Tümörün evresine (T₄ % 100, T₃ % 57, T₁&T₂ % 50) ve sigara

alışkanlığına bağlı olarak değişken oranda ekspresyon saptanırken, % 66,6 vakada en az bir antijen ekspresyonu saptanmıştır.³⁶⁵

Doolan ve ark. 103 meme kanserli olguda qRT-PCR ile PRAME mRNA'sını araştırdılar. Kontrol grubu olarak normal meme dokusunu kullandılar. Tümör dokusunun % 53'ünde ve normal meme dokusunun % 37'sinde PRAME mRNA'sını saptadılar. Tanıdan itibaren PRAME ekspresyonunun tespiti, hastalıksız sağ kalım süresi ($P=0,0004$) ve toplam yaşam süresi ($P=0,0052$) açısından kötü prognostik faktör olarak gösterildi. Çok değişkenli analiz sonucunda da, tümör evresi, tümör boyutu ve ER durumu gibi PRAME mRNA ekspresyonunda kısalmış hastalıksız yaşam süresi ve toplam yaşam süresi için bağımsız bir prognostik faktör olduğu gösterildi. Ayrıca adjuvan KT alan hastalarda PRAME ekspresyonu saptananların, PRAME ekspresyonu saptanmayanlara göre kısa nüks süresine sahip olduğu saptandı ($P=0,0291$). Sonuç olarak; meme kanserinde PRAME mRNA ekspresyonunun prognostik ve prediktif bir marker olduğunu gösterdiler.³²⁸ Van't Veer ve ark. genç meme kanserli hastalarda lenf nodu (-) sporadik meme kanserli 78 kadın hasta, gen ekspresyon profillerinde prognostik veri saptamak amaçlı incelendi. Meme kanserinin seyriyle 231 genin ilişkili olduğu saptandı. Bu genlerden biri de PRAME'di fakat seri analizler sonucunda prognoz sınıflayıcısı (tanıdan sonraki 5 yıl içerisinde uzak metastaz gelişip gelişmemesine göre iyi prognozlu ya da kötü prognozlu grup olarak kategorize edilmesini olanak sağlayan) 70 gen arasına giremedi.³⁶⁶ Epping ve ark. 295 meme kanserli hastanın gen ekspresyon verilerini, PRAME ekspresyon düzeyi yönünden çalıştılar. Çalışmaya tanı yaşı 52 ve altında, lenf nodları (-), tümör boyutu 5 cm'den küçük, primer invaziv meme kanseri olan hastalar alındı. PRAME ekspresyonu RT-PCR ile değerlendirildi. PRAME ekspresyonu 98 olguda (% 33) yüksek oranda ve 197 olguda (% 67) düşük oranda saptandı. PRAME ekspresyonuyla, yaş, tümör çapı, pozitif aksiller lenf nodu sayısı, histolojik grade, Estrojen Resptörü (ER) durumu, Lenfovasküler invazyon (LVI) karşılaştırıldı. PRAME ile histolojik grade ve ER durumu arasında ilişki bulundu. Yüksek PRAME ekspresyon seviyesiyle kötü differansiye tümör, düşük PRAME ekspresyon seviyesiyle iyi differansiye tümör arasında ilişki bulundu. ER (-) hastalarda yüksek PRAME ekspresyonu varken, ER (+) hastalarda düşük PRAME ekspresyonu saptandı. Lenf nodu durumuyla PRAME arasında bir ilişki saptanmadı. KT'nin etkisine bağlı olarak, KT alan hastalarda PRAME

ekspresyonu belirgin değildi. PRAME ekspresyonunun KT'ye cevabı değerlendirmede faydalı olabileceği belirtildi. Sonuç olarak; meme kanserli hastalarda, PRAME'in yüksek ekspresyonuyla artmış oranda uzak metastaz ve kısa süreli sağ kalım arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur.³⁶⁷ Epping ve ark. ile Doolan ve ark. meme kanseri ve PRAME ekspresyonunun meme kanserindeki prognostik önemi konusunda yaptıkları çalışmalarda PRAME kötü prognostik faktör olarak gösterilmiştir.

2.21. PRAME Hedeflenerek Yapılan İmmunoterapi

İmmunoterapinin daha az toksik olması, kemoterapetiklerden daha spesifik olması, kemoterapetikler ile sinerjizmi, relaps hastalığı önleme ve immun hafızayı indüklemeye gibi avantajları vardır.³⁰⁶ İmmunoterapilerin etkili olduğunu düşündüren uygulamalar, başta donör lenfosit infüzyonu olmak üzere, kemik iliği transplantasyonundan sonra EBV ilişkili Lenfoma gelişmesini önleyen EBV antijenlerine karşı immünoterapiler, allogeneik kemik iliği transplantasyonları, gibi yaklaşımlardır.³¹⁷

Son yıllarda T hücreleri tarafından tanınan tümör antijenleri gösterilmiş ve bunlar kullanılarak immünoterapi geliştirilmiştir.^{368,369} MAGE proteinleri melanoma olgularında immünoterapi için yararlı bir hedef olarak bulunmuştur ki PRAME de bunlarla benzerlik göstermektedir.³⁷⁰⁻³⁷¹ Bu yüzden normal kemik iliğinde ve periferik kanda yokken lösemik hücrelerde PRAME varlığından dolayı iyi bir hedef olabilir. PRAME-spesifik oligonükleotidlerle RT-PCR ile lösemik hücreleri saptamak tedavi hedefi için önemlidir.³¹⁵ T hücreleri tarafından tanınan ve ilk kez melanomada gösterilen PRAME nonamer peptiddir. Melanoma hücre yüzeyinde HLA-A*2402 ile prezente edilen bir T hücre epitopudur. STL klonu tarafından tanınır, killing inhibitory receptor (KIR) eksprese eden STL klonu yalnızca hedef hücreleri öldürme yeteneğindedir.³⁰⁸ Bu STL klonunun HLA-A*2402 (+) ve PRAME (+) lösemi hücre dizisini ve taze lösemi hücrelerini lizise uğrattığı gösterilmiştir.³¹⁷ Çocukluk çağı ALL ve AML'de, kronik lenfoproliferatif hastalıklarda da bir hedef olabileceği belirtilmiştir.^{319,318,346} Böylece PRAME hematolojik malignansilerin immünoterapisi için yararlı bir antijen olabilir. Özellikle düşük tümör yükü olan olgularda immünoterapi daha etkili olduğu için, MRH durumundaki PRAME(+) lösemili olgularda, PRAME spesifik immünoterapi uygulaması çekici bir strateji olacaktır. Örneğin tam

remisyonadaki hastalar veya donörlerden elde edilen PRAME spesifik STL, adoptif olarak transfer edilebilir.³⁵³

Spesifik T hücre yanıtları gösteren dendritik hücrelerde, lösemi ilişkili antijenlerden PRAME mRNA da gösterilmiştir ve AML dendritik hücrelerin AML’de aşı bazlı immunoterapide PRAME’in rolü olduğunu telkin etmektedir.³⁷²

Bu veriler göstermektedir ki, PRAME proteini lösemi hücrelerinin yüzeyinde prezente olur, proses edilir ve muhtemelen lösemili olgularda CTL tarafından tanınan bir hedef antijendir.³⁵⁴ PRAME ilişkili immun yapılanma ve immunoterapinin mekanizması önümüzdeki yıllarda çok daha fazla anlaşılacak ve klinikte yerini bulacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya, 1998 ve 2012 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalında Hodgkin Lenfoma tanısı almış olgulardan klinik takip ve/veya patoloji örneklerine ulaşılabilen 110 hasta alındı. Hastalara ait demografik, klinik ve laboratuvar verileri dosyalardan edinildi. Hastaların risk belirlemesi IPS skorlamasına göre yapıldı (tablo 9). IPS dışında eritrosit sedimantasyon hızı ≥ 50 ve < 50 ve Beta 2 mikroglobulin normal ve normal değerin üstünde olmak üzere gruplanarak kıyaslamalar yapıldı.

International Prognostic Score (IPS) her hasta için hesap edildi. Hastada mevcut her faktöre bir puan verilerek oluşan toplam 0-7 arasında bir skor belirlendi. Hasta sayısının görece kısıtlı olması nedeniyle 2. değerlendirmede hastalar IPS skoruna göre 1-3 risk ile 4 ve üstü riski olanlar olmak üzere iki grup olarak ayrıldı.

Tablo 9. HL İçin Uluslararası Prognostik İndekse Göre Kötü Risk Faktörleri

Parametre	Özellik
Serum albumin	< 4 g/dl
Hemoglobin	< 10.5 g/dl
Cinsiyet	Erkek
Yaş	> 45
Evre	Evre IV Hastalık
Beyaz küre sayısı	$\geq 15.000/\text{microL}$
Absolü lenfosit sayısı	$< 600/\text{microL}$ ve/veya total Beyaz Küre sayısının $< \%8$

*Hastalarda bulunan her bir özellik için 1 puan verilir, total skor 0-7 arasında olur

Hastaların evresi tanı anındaki Ann Arbor evrelendirmesi- Cotswolds modifikasyonuna göre yapıldı. Yanıt durumu, evrelemede kullanılan tanı yöntemine göre standart yanıt kriterleri kullanılarak belirlendi.

Evreleme amacıyla tutulan lenf nodları tek bir radyasyon alanını kapsayan anatomik bölgelere göre ayrıldı. Buna göre; a-Waldeyer Halkası (tonsil, dil tabanı, nazofarenks), ipsilateral servikal, supraklavikular, oksipital, preaurikular tek bir bölge. b-İnfraklavikular ayrı bir bölge. c-Aksiller pektoral d-Mediyastinal (Timus, prevasküler, aortapulmoner, paratrakeal, pretrakeal, subkarinal ve posterior mediyastinal) tek bir bölge e-Hiler ayrı bir bölge f-Paraaortik g-İliak, İpsilateral h-İnguinal ve femoral, 1-

Epitroklear j-brakiyal toplam 10 bölge üzerinden hastanın tutulan alanları her hasta için kaydedildi. Kaydedilen sayılara göre, 3 ve altı ile 4 ve üstü alan tutulumlarına göre iki grupta incelendi. Ayrıca tutulan alanlar diyafragmanın altı veya üstü veya hem altı hem üstü olarak kaydedildi. Bulky (yüksek tümör yükü) hastalık olarak 10 cm üstü kitle olarak kaydedildi. Mediyastinal kitleler; kitlenin maksimum çapı/maksimum toraks çapına göre >0.33 ve <0.33 olarak ayrıldı. Bu ayırmada dosyalardaki BT veya PET-BT görüntülerine göre karar verildi. Tanı anında ektranodal hastalık varlığı, yeri/yerleri kaydedildi.

Hastalar evre ve bazı klinik özelliklerine göre risk gruplarına ayrıldılar. Buna göre;

1-Evre I-II Olumlu risk grup (NCCN'e göre aşağıdaki kriterlerin hiçbirisinin olmadığı)

2-Evre I-II olumsuz risk grup

3-Evre 3-4 veya evre IIB ve ilave olarak büyük mediyastinal kitle olması veya ektranodal tutulum olan vakalar ileri evre gruplar olarak belirlendi.

NCCN olumsuz kriterler:

1-ESH ≥ 50

2-B semptomlarından herhangi biri

3-Mediyastinal kitle oranı 0.33'ten büyük

4-Nodal Alan Sayısı 3'ten fazla

5-10 cm'den büyük kitle varlığı

Hastaların aldıkları tedavi ilk basamak tedavi olarak ve herhangi bir relaps sonrası aldıkları ikinci, üçüncü, dördüncü, beşinci basamak tedaviler olarak kaydedildi. Hastaların özellikle ilk relaps tarihi belirlenerek kaydedildi. Ayrıca hastalar ilk relaps tarihine göre ≤ 12 aydan kısa sürede relaps saptananlar ve >12 aydan sonra relaps saptanan olgular olarak ayrıldı. Ayrıca hastaların RT alma durumu ve eğer yapılmışsa kök hücre transplantasyon durumu kaydedildi.

Histopatolojik değerlendirmeler fakültemiz Patoloji Ana Bilim Dalı tarafından NLP HL ve Klasik HL (NS, MS, LF, LZ tip) olarak değerlendirildi. Düzenli kayıtlarına ve verilerine ulaşılabilen 110 olgu alındı ancak Patoloji Bilim Dalından iki hematopatolog tarafından 28 olguda doku örneklerinde yeterli materyal saptanamadığı için IHK olarak toplam 82 hastada PRAME değerlendirilebildi. PRAME boyama

özelliğine göre (-), (+) ve (++) olarak değerlendirildi. Prame (+) olgu sayısının görece az olması nedeniyle olgular PRAME ekspresyonu olup olmamasına göre iki gruba ayrıldı. İmmunhistokimyasal analiz yapılan 82 olgunun tamamında RT- PCR ile de PRAME çalışıldı.

3.1. İHK Yöntemle PRAME Çalışma Yöntemi

1. Patoloji Bölümünce, kasetlenip % 10'luk formaldehitte bekletilmiş ve aynı gün akşam ototeknikon cihazında fiksasyon işlemine uğratılmış ve ertesi gün sabah parafin blok haline daha önce getirilmiş dokular çıkarıldı.

2. Parafine gömülü dokulardan 4-5µ kalınlığında kesitler polylysine lam üzerine alındı.

3. Önce 60 derecelik etüv içerisindeki xylol de 10-15 dakika bekletildi. Daha sonra oda ısısındaki xylol, ,dreceli alkol ve saf su serisinden geçirilerek deparafinizasyon işlemi tamamlandı.

4. 0,3 % w/v H2O2 in distile suda 5-7 dakika bekletildi.

5. Saf suda yıkandı.

6. Mikrodalga fırında 600W gücünde CİTRAT buffer solüsyonunda (ph:6) 15 dakika kaynatılarak antijen retriwal işlemi uygulandı. Kapağı açılmadan oda ısısına gelmesi için yaklaşık 45 dakika bekletildi.

7. Saf su ve PBS (Phosphate buffer saline)'den geçildi (PBS ph: 7,2-7,4).

8. Daha önceden 1/80 oranında dilüe edilmiş olan PRAME primary antibody (Abcam marka. Mouse polyclonal to PRAME Cat no: ab 89097) damlatıldı. Yine kapalı ve nemli ortamda oda ısısında +4 °C de 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün oda ısısına çıkarıldı ve oda ısısına gelmesi için yaklaşık 2 saat bekletildi.

9. Saf su ve PBS'den geçirildi.

10. Biotin damlatıldı. Oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.

11. Saf su ve PBS'den geçildi.

12. Avidin damlatıldı. Oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.

13. Saf su ve PBS'den geçirildi.

14. AEC damlatıldı. 10-20 dakika aralığında preparatlar mikroskop altında kontrol edilerek boyanma gözlendiğinde çeşme suyuna alındı.

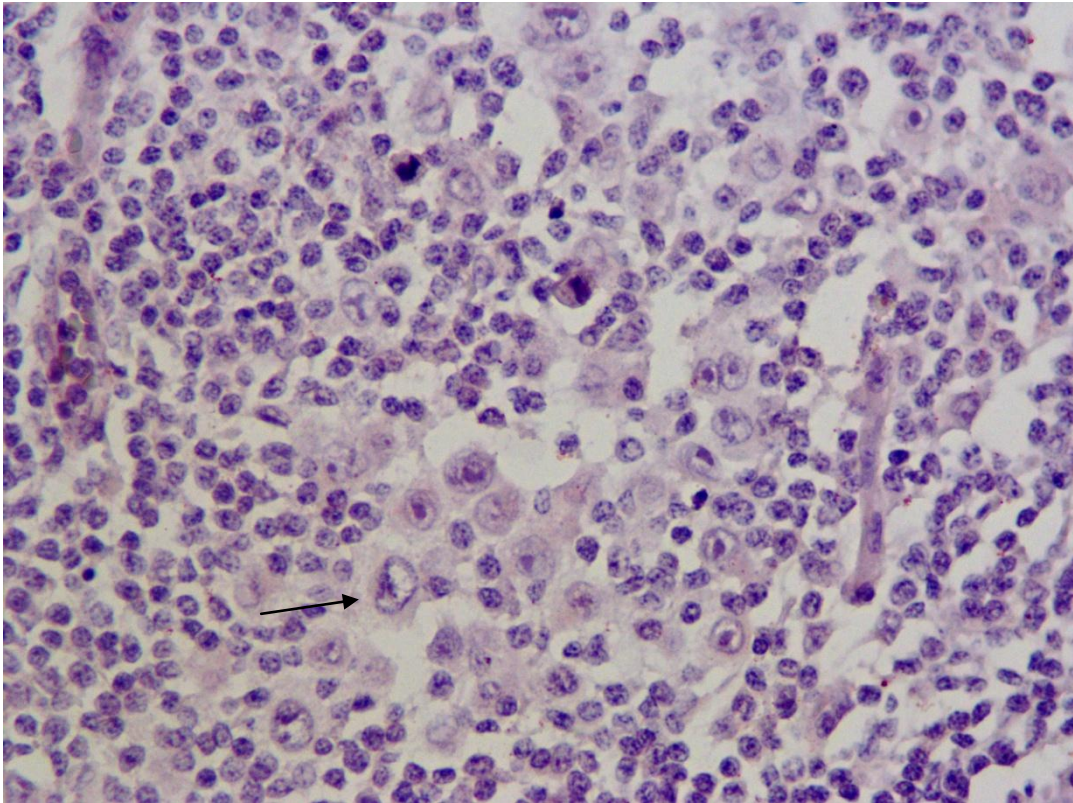
15. Saf suda yıkanarak hemotoksilene alındı. 7-10 dakika bekletilip tekrar çeşme suyunda yaklaşık 10 dakika bekletilerek mavileştirildi.

16. Dokunun etrafı kurulanıp su bazlı sıvı kapama maddesi ile kapatıldı.

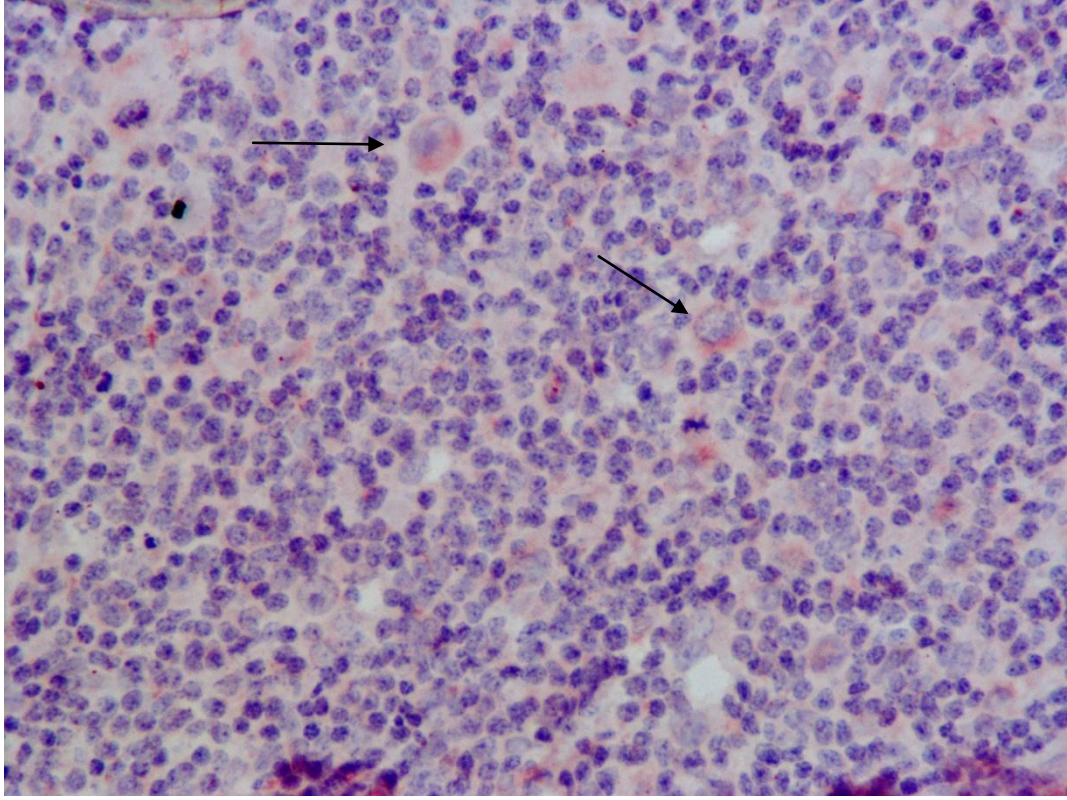
Kullanılan Universal kit: Scytek Laboratories (USA) , SensiTek HRP Anti – Polyvalent kit . Cat no: SHP 125

3.2. İmmunhistokimyasal Yöntemle PRAME'in Değerlendirilmesi

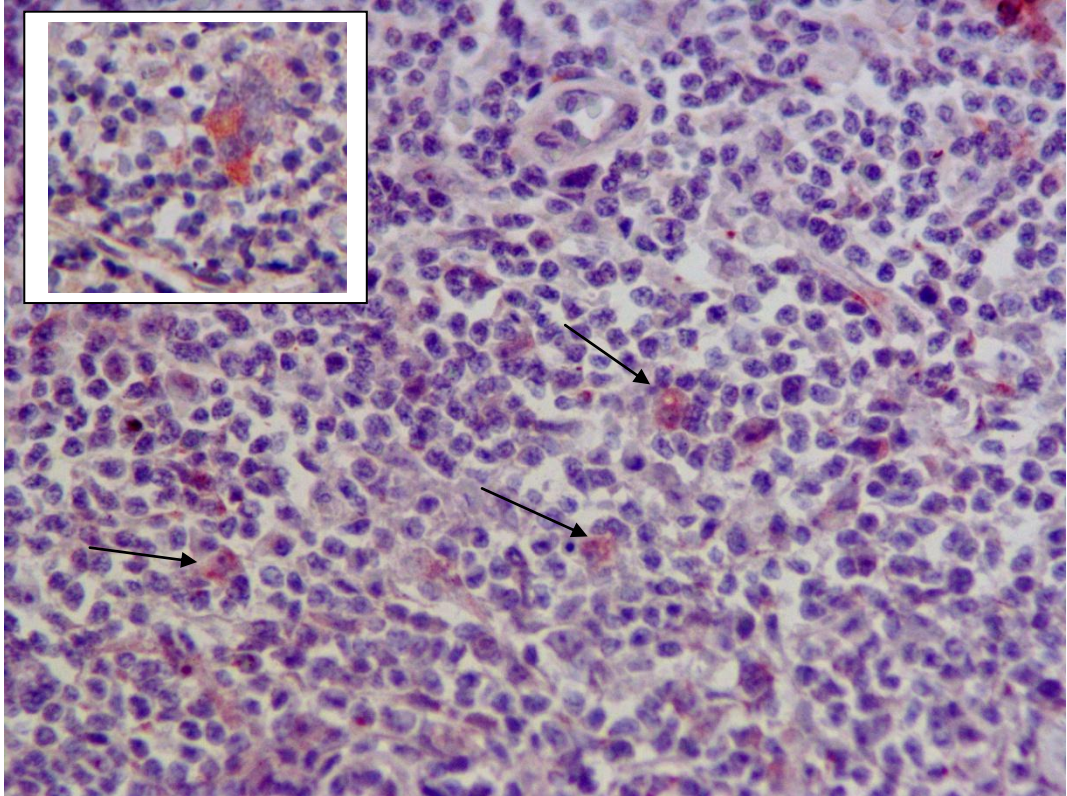
Parafin blok haline getirilen dokular İHK olarak boyandı. Preparatlar Ç.Ü.T.F. Patoloji Anabilim Dalı'ndaki iki patolog tarafından değerlendirildi. Boyanmanın yoğunluğuna göre +, ++ olarak değerlendirildi (Şekil 1,2,3). Boyanmanın temel olarak sitoplazmik olduğu belirlendi. PRAME saptanan olguların çoğunda çevre histiyositlerde sitoplazmik boyanma dikkati çekti (Şekil 4).



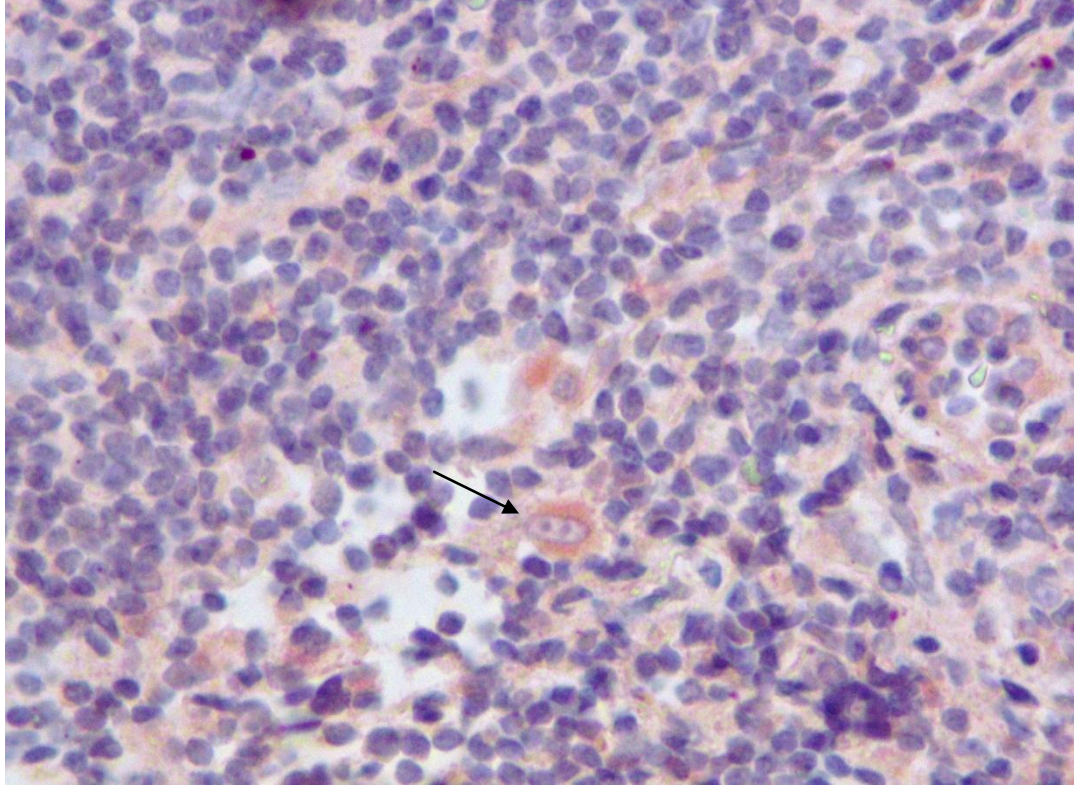
Şekil 1. Reed-Sternberglerde PRAME boyanması negatif (-) (İHKx40)



Şekil 2. Reed-Sternberglerde PRAME boyanması (sitoplazmik +) (İHKx40)



Şekil 3. Reed-Sternberglerde PRAME boyanması (sitoplazmik ++) (İHKx40)



Şekil 4. Histiysitlerde sitoplazmik Prame boyanması (+) (İHKx40)

3.3. RT-PCR Yöntemiyle PRAME Çalışma Yöntemi

3.3.1. Formalin Fixed Parafin Embedded (FFPE) Dokudan RNA İzolasyonu

Formalin Fixed Parafin Embedded (Formalin ile fiske edilmiş parafine gömülü) (FFPE) doku örneklerinden RNA izolasyonu için Roche High Pure miRNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, 05080576001) kullanıldı.

Kit içeriği:

- | | |
|---------------------------------|---|
| 1. Paraffin Tissue Lysis buffer | 20 ml |
| 2. Proteinaz K (Liyofilize) | 100 mg (Üzerine 4.5 ml elution buffer eklendi) |
| 3. Binding buffer | 80 ml |
| 4. Binding Enhancer | 20 ml |
| 5. Wash buffer | 2x10 ml (Üzerine 40 ml absolute etanol eklendi) |
| 6. Elution buffer | 30 ml |
| 7. Filtreli tüpler | 100 adet |
| 8. Collection tüpler | 100 adet |

İzolasyon prosedürü:

İzolasyon, kitin FFPE örnekler için önerdiği üzere iki aşamalı olarak yapıldı.

Birinci aşama ile FFPE dokuların parafinden uzaklaştırılması ve dokunun parçalanarak hücre içeriğinin elde edilmesi sağlandı, 2. aşama ile hücre lizatından RNA izolasyonu yapıldı.

İzolasyonda birinci adım protokolü:

1. FFPE örneklerin bulunduğu 1.5 ml'lik ependorf tüplere 800 µl ksilen eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında tüpler alt üst edilerek inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonunda tüplere 400 µl etanol eklendi ve vortekslendi. 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
3. Tüplere 1 ml etanol eklendi, 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
4. Tüpteki alkolün tamamen uzaklaştırılması için tüpler kağıt havlu üzerine ters çevrilerek 55°C'lik inkübatörde 10 dakika bekletildi.

İzolasyonda ikinci adım protokolü:

1. Tüplere 100 µl paraffin tissue lysis buffer (16 µl %10'luk SDS ve 40 µl Proteinaz K) eklendi. Karışım vortekslendi ve bir gece 55°C'de bekletildi.
2. İnkübasyon sonrası 150 µl hücre lizatı yeni bir ependorf tüpüne alındı ve üzerine 312 µl binding buffer, 200 µl binding enhancer eklendi ve karıştırıldı. Karışım filtreli toplama tüpüne alınarak 14.000 rpm'de 30 sn.ye santrifüj edildi.
3. Filtre yeni bir toplama tüpüne aktarıldı, üzerine 500 µl wash buffer eklendi ve 14.000 rpm'de 30 sn.ye santrifüj edildi.
4. Filtre yeni bir toplama tüpüne aktarıldı, üzerine 300 µl wash buffer eklendi ve 14.000 rpm'de 30 sn.ye santrifüj edildi.
5. Filtre yeni bir toplama tüpüne aktarıldı ve 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
6. Filtre yeni bir kapaklı ependorf tüpe aktarıldı, filtrenin tam ortasına gelecek şekilde 50 µl DNase-RNase içermeyen su eklendi, oda sıcaklığında 1 dk. inkübe edildi ve 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
7. İçinde total pure RNA bulunan tüp içeriği, çalışmanın ilerleyen aşamalarında kolaylık sağlaması açısından 96 kuyuluk piko plak içerisine alındı ve -80°C'de saklandı.

3.3.2. Primerlerin Hazırlanması

Liyofilize olarak temin edilen PRAME ve ACTB (QuantiTect, Qiagen) primerleri üretici firmanın talimatlarına göre gerekli miktarda Tris-EDTA (TE) tamponu ile sulandırıldı, vortekslendi ve kısaca santrifüj edildikten sonra -20°C’de saklandı.

3.3.3. Pure Total RNA’dan Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi

cDNA Sentez Aşaması: Elde edilen RNA’ları komplementer DNA’ya çevirmek için miScript RT kiti (Qiagen) kullanıldı. Kit içeriğini miScript RT Buffer (5X), miScript reverse transcriptase mix, RNase içermeyen su oluşturmaktadır. Kullanıma başlamadan önce bütün solüsyonlar ve RNA örnekleri buz üzerinde tutularak erimeye bırakıldı.

cDNA sentezinde 90 örnek için ölü hacimler hesaplanarak cDNA karışımı hazırlandı. Karışımda örnek başına 1µl MiScript RT Buffer (5X) ve 0.25 µl MiScript Reverse Transcriptase Mix 16 kanallı otomatik pipet yardımı ile 96 kuyuluk piko plak’a her kuyuda 1.25 µl olacak şekilde dağıtıldı. Karışım üzerine 3.75 µl RNA örneği yine 16 kanallı otomatik pipet yardımı ile dağıtıldı, böylece reaksiyon final hacmi 5 µl olacak şekilde hazırlandı. Plak yapışkan film ile kapatılarak plak karıştırıcıda 3000 rpm’de 3 dk. karıştırıldı, kısaca plak santrifüjünde santrifüj edildi ve Thermo PikoReal 96 Real-Time PCR System (Thermo Scientific) cihazında aşağıdaki ısı döngülerine maruz bırakıldı.

37°C’de 60 dakika

95°C’de 5 dakika

Bu aşamanın tamamlanması ile cDNA sentezi tamamlandı ve örnekler bir sonraki adım için -20’de muhafaza edildi.

Pre-amplifikasyon Aşaması: Preamplifikasyon karışımı 90 örnek için ölü hacimler hesaplanarak hazırlandı. Aşağıdaki karışım hazırlanarak 16 kanallı otomatik pipet yardımı ile 96 kuyuluk piko plak’a her kuyuda 3.75 µl olacak şekilde dağıtıldı. Karışımın üzerine 1.25 µl cDNA eklenerek reaksiyon final hacmi 5 µl olarak ayarlandı. Plak yapışkan film ile kapatıldı, 3000 rpm’de 3 dakika plak karıştırıcıda karıştırıldı, kısaca plak santrifüjünde santrifüj edildi ve PikoReal 96 Real-Time PCR System (Thermo Scientific) cihazında aşağıdaki ısı döngülerine maruz bırakıldı. Primer pool ACTB ve PRAME primerlerinin 0.2X konsantrasyonda hazırlanması ile elde edildi.

Taqman Preamp Mater Mix (Applied Biosystems)	300.00 µl
Primer Pool (ACTB ve PRAME)	150.00 µl
TOPLAM	450,00 µl

95°C’de 10 dakika

95°C’de 15 saniye
14 döngü
60°C’de 4 dakika

Bu aşamanın sona ermesi ile preamplifikasyon aşaması tamamlandı ve örnekler bir sonraki adım için -20’de muhafaza edildi.

Eksonukleaz Aşaması: Preamplifikasyon ürünlerinin primer dimerlerinden arındırılması için uygulanan bu aşamada Biolabs Exonuclease Kit (Biolabs, #MO293L) kullanıldı. Kit içeriğini Exonuclease I Reaction Buffer ve Exonuclease I Enzim oluşturmaktadır. Exonuclease karışımı 90 örnek için ölü hacimler hesaplanarak hazırlandı. Karışımda örnek başına 0.2 µl Exonuclease I Reaction Buffer, 0.4 µl Exonuclease I Enzim ve 1.4 µl DNase-RNase içermeyen su kullanılarak hazırlandı ve 16 kanallı otomatik pipet yardımı ile içerisinde 5 µl preamplifiye cDNA’lar bulunan plak’a 2 µl dağıtılarak reaksiyon final hacmi 7 µl olacak şekilde hazırlandı. Piko plak yapışkan film ile kapatıldı, 3000 rpm’de 3 dakika plak karıştırıcıda karıştırıldı, kısaca plak santrifüjünde santrifüj edildi ve PikoReal 96 Real-Time PCR System (Thermo Scientific) cihazında aşağıdaki ısı döngülerine maruz bırakıldı.

37°C’de 30 dakika

80°C’de 15 dakika

Bu aşamanın da tamamlanması ile örnekler 1:5 oranında TE ile dilüye edildi ve gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için Real-Time PCR işlemine geçildi.

3.3.4. PRAME ve ACTB Gen Ekspresyonlarının Real-Time PCR ile Belirlenmesi

Gen ekspresyonu aşamasında Fast EvaGreen qPCR Master Mix (Biotium, 31003-1) kullanıldı. Kit içeriği 2X master mix ve 10X ROX reference dye oluşturmaktadır. Real-Time PCR için master mix karışımı 90 örnek için ölü hacimler hesaplanarak hazırlandı. Karışımda her örnek için 2.5 µl master mix, 0.25 µl primer, 0.25 µl DNase-RNase içermeyen su 16 kanallı otomatik pipet yardımı ile 96’lık piko

plak'a her kuyuda 3µl olacak şekilde dağıtıldı. Karışıma 2 µl 1:5 dilüye preamplifiye cDNA örnekleri yine 16 kanallı otomatik pipet yardımı ile dağıtılarak final hacim 5 µl olacak şekilde hazırlandı. Piko plak yapışkan film ile kapatıldı, 3000 rpm'de 3 dakika plak karıştırıcıda karıştırıldı, kısaca plak santrifüjünde santrifüj edildi ve PikoReal 96 Real-Time PCR System (Thermo Scientific) cihazında gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için aşağıdaki ısı döngülerine maruz bırakıldı.

95°C'de 2 dakika
95°C'de 15 saniye }
45 döngü }
60°C'de 30 saniye }
60°C- 95°C } Melting curve

Melting curve aşamasında her 0.2 °C'lık ısı artışı için geçen süre 1 saniyedir. Dolayısı ile 60°C'den 95 °C'ye kadar ısının çıkışı için geçen süre yaklaşık 3 dakikadır.

Melting curve analizi ile amplikonun Tm (temperature of melting) derecesi saptanabilir. Amplifikasyon sonrası çoğaltılan her DNA ürününün içerdiği baz türüne ve uzunluğuna bağlı Tm derecesi vardır. Tm, çift zincir DNA'nın %50'sinin tek zincir hale gelmesi için gerekli sıcaklıktır. Amplifikasyon sırasında çift zincir DNA'ya bağlanan boyaların floresan şiddeti artacaktır. Melting curve sırasında sıcaklık yavaş yavaş yükseltilir, artan sıcaklığa bağlı olarak çift sarmal zincirler ayrılmaya başlar ve floresans ışımada azalma olur. Bu aşamada belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı ölçülür. Klinik örneğe ait Tm derecesi, kullanılan pozitif kontrol ile kıyaslanarak sonucun doğruluğu araştırılır.

Bu işlem hem PRAME hem de ACTB primerleri için iki kez tekrarlanmıştır. Çalışmada kullanılan ısı döngüleri Fast EvaGreen qPCR master mix kit içeriğindeki talimat ve Quantitect primerlerin özelliklerine göre belirlenmiştir.

3.4. İstatistiksel Metod

Verilerin normal dağılıma uygunluğu test edilmiş, normal dağılım gösteren sürekli değişkenlerin analizinde bağımsız gruplarda t testi, normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenlerin analizinde ise Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Kategorik değişkenlerin analizinde ise ki-kare testi kullanılmıştır. Sağkalım analizlerinde Kaplan-

Meier yöntemi, log rank testi ve çoklu karşılaştırmalarda cox regresyon analizi kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama±standart sapma veya ortalama±SS (Standart Sapma), medyan (Alt Sınır-AS ve Ust Sınır-US), n ve yüzde olarak ifade edilmiştir. p değerinin <0,05 olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 16.0 paket programı kullanıldı.

5. BULGULAR

Çalışmaya, toplam 110 hasta alınmıştır. Hastaların 55'i erkek ve 55 kadın, yaş ortalaması $35,92 \pm 13,67$, ortanca değeri 34 (alt-üst:15-71) idi (tablo 10). Hastaların 79'u (% 71,8) 45 yaş altı ve 31'i 45 yaş üstündeydi. Histolojik sub gruplar değerlendirildiğinde hastaların 12(% 10,9)'nun subtipi belirlenemedi. Klasik tip HL olguları arasında 46 olguda NS (% 41,8) ve 44 olguda MS tip HL (% 40) saptandı. Diğer histolojik tipler sıklıklarına göre 2 olguda (% 1,8) LF, 1 olguda (% 0,9) LZ HL subtipi saptandı. Toplam 5 olguda (% 4,5) NLP HL saptandı.

Hastaların büyük çoğunluğunda (57(% 55,9) olguda) diyafragmanın üstündeki alan tutulmuştu, Hastaların 35'inde (% 34,3) olguda diyafragma altı ve üstü tutulmuştu, 10(% 9,8) olguda ise sadece diyafragma altı tutulmuştu. 8 olguda diyafragmaya göre lokalizasyon saptanamadı. Hastaların dosya bilgilerinden alınan anamnez bulgularına göre 110 hastanın B semptomu olup olmadığı değerlendirildi ve buna göre hastaların 74'ünün (% 67,3) B semptomu varken 33 olguda B semptomu yoktu.

Laboratuvar Verileri: Hastaların büyük çoğunluğunda (103(% 93,6)) lokositoz ($\geq 15.000/\text{mm}^3$) yoktu. Lokosit ortalaması 8871 ± 4112 , ortanca değeri 8555(1770-29400) idi. 28 (% 25,5) hastada anemi ($\text{Hb} < 10,5 \text{ g/dl}$), 12(% 10,9) hastada lenfositopeni (beyaz kürenin % 8'den azı veya $< 600/\text{mm}^3$), 43(% 39,1) hastada hipoalbuminemi ($< 4 \text{ g/dl}$) saptandı. Hemogloblin ortalaması $11,8 \pm 2,06$, ortanca değeri 11,9(8,0-16,0), Lenfosit ortalaması 1598 ± 605 , ortanca değeri 1680(220-3000), Albumin ortalaması $4,05 \pm 0,67$, ortanca değeri 4,10 (1,60-5,30) saptandı. Hastaların 47'sinin (% 42,7) sedimantasyonu ≥ 50 ve üzerinde saptandı. Sedimantasyon ortalaması $44,4 \pm 28,5$, ortanca değeri 38,6(2,00-123,0) idi. Beta 2 mikroglobulin toplam 75 hastada saptanabildi ve 29 (% 38,7) hastada normalin üstündeydi.

Hastaların evrelerine bakıldığında 10'u (% 9,1) evre 1, 54'ü (% 49,1) evre 2, 31'i (% 28,2) evre 3, 15'i (% 13,6) evre 4 olarak değerlendirildi (tablo 11). Toplam 10 lenf nodu bölgesine göre her hasta için tutulan lenf nodu sayısı 102 olguda saptanabildi ve lenf nodu tutulum ortalaması $3,06 \pm 1,38$, ortancası 3 (min/max:1/6) idi. Buna göre tek, iki, üç, dört, beş, altı ve üstü nodal alan tutulumlarına göre sırasıyla hasta sayı ve yüzdeleri 9(% 8,8), 34(% 33,3), 25(% 24,5), 17(% 16,7), 7(% 6,9), 10(% 9,8) olarak belirlendi.

Tablo 10. Demografik, Klinik, Laboratuvar Verileri (n:110)

		N(%)
Cinsiyet	Kadın	55(50,0)
	Erkek	55(50,0)
Yaş	<45	79(71,8)
	≥45	31(28,2)
Yaş*	Ort±SS	35,9± 13,7
	(AS-US)	34,0 (15,0-71,0)
Subtip	Noduler Lenfosit Predominat	5(4,5)
	Klasik	
	Noduler Sklerozan	46(41,9)
	Miks Sellüler	44(40,0)
	Lenfosit Fakir	2(1,8)
	Lenfosit Zengin	1(0,9)
	Tiplendirilemeyen	12(10,9)
Lokalizasyon (n:102)	Diyafragma Altı	10(9,8)
	Diyafragma Üstü	57(55,9)
	Diyafragma Altı ve Üstü	35(34,3)
B semptom	Var	74(67,3)
	Yok	36(32,7)
Lokosit	<15000-mm³	103(93,6)
	≥15000-mm³	7(6,4)
Lokosit*	Ort±SS	8871± 4112
	Ortanca (AS-US)	8555(1770-29400)
Hemoglobin	<10,5g-dl	28(25,5)
	≥10,5g-dl	82(74,5)
Hemoglobin*	Ort±SS	11,8± 2,06
	Ortanca (AS-US)	11,9 (8,0-16,0)
Lenfosit	<600 mm³	12(10,9)
	≥600 mm³	98(89,1)
Lenfosit*	Ort±SS	1598± 605
	Ortanca (AS-US)	1680(220-3000)
Albumin	<4g-dl	43(39,1)
	≥4g-dl	67(60,9)
Albumin*	Ort±SS	4,05± 0,67
	Ortanca (AS-US)	4,10 (1,60-5,30)
Sedimentasyon	<50	63(57,3)
	≥50	47(42,7)
Sedimentasyon*	Ort±SS	44,4± 28,5
	Ortanca (AS-US)	38,6 (2,00-123,0)
B2mikroglobulin	Yüksek	29(38,7)
	Normal	46(61,3)

* veriler **Ortalama±SS** ve **Medyan (AS-US)** olarak gösterilmiştir (Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, AS: Alt Sınır, US: Ust Sınır)

Tutulan alan sayısına göre 2 gruba ayrılan hastaların çoğunluğu tutulan lenf nodu sayısı 3 ve altında nod varlığı 68(% 66,7) olguda saptanırken 4 ve üzerinde nod tutulumu olan hasta sayısı 34(% 33,3) idi. Mediastinal tutulum değerlendirildiğinde 57 (% 51,8) hastada mediastinal tutulum varken 53 hastada mediastinal tutulum yoktu. Hastalar mediastinal kitleleri, mediastinal kitle oranına (kitlenin maksimum

çapı/maksimum intratorasik çapı) göre $>0,33$ ve $<0,33$ olarak ayrıldığında 12 (% 10,9) hastanın kitlesi toraks çapının üçte birinden fazla iken 45 (%40,9) olguda mediastinal kitle toraks çapının üçte birinden daha büyük idi. Sadece 2 olguda (% 1,8) 10 cm ve üstünde yüksek tümör yükü mevcuttu. Ekstranodal hastalık değerlendirildiğinde 22(% 20) olguda ekstranodal tutulum mevcutken, 88 olguda ekstranodal tutulum yoktu. En sık tutulum yeri kemik iliği olarak saptandı.

Tablo 11. Klinik Verileri (n:110)

		N(%)
Evre	I	10(9,1)
	II	54(49,1)
	III	31(28,2)
	IV	15(13,6)
Tutulan alan sayısı (n:102)	1-3	68(66,7)
	≥ 4	34(33,3)
Tutulan alan sayısı (n:102)*	Ort$\pm$SS	3,06 $\pm$ 1,38
	Ortanca (AS-US)	3,00 (1,00-6,00)
Mediastinal Tutulum	$>0,33$	12(10,9)
	$<0,33$	45(40,9)
	Yok	53(48,2)
Mediastinal Tutulum	Var	57(51,8)
	Yok	53(48,2)
Bulky	Var	2(1,8)
	Yok	108(98,2)
Ekstranodal Tutulum	Var	22(20)
	Yok	88(80)
Risk grubu	Evre I-II iyi	39(35,5)
	Evre I-II kötü	31(28,2)
	Evre III-IV	40(36,3)
IPS	1-3	97(88,2)
	≥ 4	13(11,8)
IPS*	Ort$\pm$SS	1,72 $\pm$ 1,39
	Medyan (AS-US)	1 (0-6)
Radyoterapi	Hayır	47(46,5)
	Evet	54(53,5)
Nüks	Hayır	74(67,3)
	Evet	36(32,7)
Yanıt şekli	Tam	78(70,9)
	Kısmi	23(29,1)
Son durum	Ölmüş	18((16,4)
	Yaşıyor	75(68,1)
	Bilinmiyor	17(15,5)

* veriler Ortalama $\pm$ SS ve Medyan (AS-US) olarak gösterilmiştir (Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, AS: Alt Sınır, US: Ust Sınır)

Risk gruplarına göre 3 gruba ayrılan hastaların, 39'u (% 35,5) evre I-II olumlu risk grubunda iken, 31'i (% 28,2) evre I-II olumsuz risk grubunda, 40'ı (% 36,4) ileri evrede olgular. IPS skorlamasına göre hastaların IPS ortalaması $1,72 \pm 1,39$, median değeri 1(min/max:0/6) idi. IPS skorlarına göre hastaların 97'sinde (% 88,2) IPS 3 altında iken 13'ünde (% 11,8) 4 ve fazla risk faktörü vardı.

Toplam 107 (% 97,3) hastanın tedavi detayı saptanabildi. Buna göre tanıdan sonra ilk basamak tedavi olarak 103 hasta (% 96,3) ABVD protokolü aldı, 1 hasta (% 0,9) sadece RT, 1 hasta (% 0,9) COPP-ABVD aldı, bir hastanın (% 0,9) ise hiçbir tedaviyi almadığı veya kabul etmediği anlaşıldı. Geriye kalan 3 hastanın (% 2,7) tedavisi ile ilgili bilgiye ulaşamadı. Relaps sonrası ikinci basamakta 38 hastaya (% 38) KT verildi. En çok DHAP 25 hasta (% 65,8) aldığı anlaşıldı. Bundan başka sırayla ABVD 9 hasta (% 21,1), Ifosfamid-Carboplatin-Etoposid (ICE) 3 hasta (% 7,9), Gemcitabin+Cisplatin ve MOOP protokolleri için birer hasta (% 2,6) olmak üzere sıralandı. Toplam 21 hastaya 3. Basamak (% 21,4) KT verildi. Üçüncü basamakta en çok Gemcitabin + Vinorelbin protokolü 8 hastaya (%38) verildi. 7 hastaya (% 33,2) Deksmetazon-Sitozin Arabinozid-Sisplatin (DHAP) protokolü verildi. Diğerleri sırayla hepsi 1 hasta (% 4,8) ICE, Gemcitabin + Cisplatin, Gemcitabin+ Doksorubicin, Etoposid-SitozinArabinozid-Sisplatin-Salumedrol (ESHAP), Ifosfamid-İdarubicin Etoposide ve Gemcitabin+Oxaliplatin protokollerinden oluşmaktaydı. Dördüncü basamak tedavi olarak 10 (% 10,2) hastaya en çok ICE protokolü verildi. Diğerleri sırayla Brentuximab, Gemcitabin + Cisplatin protokollerinden ikişer hasta (% 20), Gemcitabin + Oxaliplatin, Gemcitabin + Vinorelbin, CCNU + Etoposide + Klorambusil + Prednizolon protokollerinden birer hastadan (% 10) oluşmaktaydı. 101 olguda RT durumu değerlendirildi. Buna göre hastaların 54'ü (% 53,5)'ü RT alırken, 47'si RT almamıştı. Hastaların kök hücre transplantasyonu yapılması ile ilgili olarak 97 hasta değerlendirilebildi. Hastaların 10'nuna (% 10,3) kök hücre transplantasyonu yapıldı.

Hastaların tedavi olarak aldığı KT'ler sonrasında ilk relaps tarihi olarak kaydedilmiş olan hastalar nüks etmiş hastalar olarak kabul edildiğinde hastaların 36'sının (% 32,7) nüks olduğu, 74'ünde ise nüks olmadığı görüldü. Tüm hastalar yanıt durumlarına göre değerlendirildiğinde 110 hastanın hepsi tam veya kısmi yanıt vermiştir. Hastaların 78'inde (% 70,9)'i tam ve 32'sinde kısmi yanıt alınmıştır. Yapılan

detaylı araştırma sonrasında hastaların 18'inin (% 16,4) öldüğü saptandı, 17 (% 15,5) olgunun son durumu hakkında bilgi edinilemedi.

IHK olarak toplam 82 hastada PRAME değerlendirildi. Toplam 15 hastada boyanma saptandı (tablo 12). 5 (% 6,1) hastada (++), 10 (% 12,2) hastada (+) boyanma mevcuttu. Toplamda olguların 15'inde (% 18,3) PRAME pozitif iken 67 (% 81,7) olguda PRAME ekspresyonu saptanmadı. RT-PCR yöntemi ile 82 hastada PRAME çalışıldı. 8 hastada (% 9,8) PRAME ekspresyonu saptandı. PRAME ekspresyonu çok hafif ekspresyondan normalin 244 katı kadar yüksek ekspresyona kadar değişmekteydi (1,52-244,51 kat). RT-PCR ile PRAME pozitif saptanan olguların 3'ü MS, 4'ü NS, 1'i LF tip HL iken 1'i klasik tip sınıflandırılmayan HL olarak değerlendirildi. IHK olarak PRAME pozitif saptanan olguların 4'ü MS, 9'u NS, 1'i NLP, 1'i LF tip HL olarak değerlendirildi.

Tablo 12. IHK ve RT-PCR ile PRAME Bakılan Olgularla İlgili Sonuçlar

		N (%)
PRAME IHK	Negatif	67(81,7)
	(+)	10(12,2)
	(++)	5(6,1)
	Negatif	67(81,7)
	Pozitif	15(18,3)
PRAME RT-PCR	Negatif	74(90,2)
	Pozitif	8(9,8)

Toplam 110 hasta için yapılan hastalıksız sağkalım (HSK) analizinde, cinsiyete göre kadınlarda HSK daha uzun görünse de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (tablo 13). Hastalar 45 yaş sınırına göre gruplandırıldığında 45 yaş üstü hastalarda HSK daha kısa bulundu ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p:0,0001). B semptomu olan hastaların HKS'ları, B semptomu olmayanlara göre daha uzun saptandı ise de fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Sedimentasyon hızı 50'den yüksek olan grupta HSK daha uzun saptansa da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Aynı şekilde Beta 2 mikroglobulin normalden yüksek olan hastalarda HSK Beta 2 mikroglobulin normal olan hastalardan daha kısaydı fakat fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Hastaların evreleri yükseldikçe HSK'ları kısa bulundu ve fark anlamlı bulundu (p:0,009). Diğer yandan

tutulan lenf nodu alanlarının sayısı 1-3 olan hastaların HSK'ları 4 ve üzerinde lenf nodu tutulumları olanlardan daha uzun olmasına karşın anlamlı fark bulunmadı. Mediyastinal tutulum olan hastaların HSK'ları, mediyastinal kitlesi olmayanlara göre daha düşük saptansa da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Buna karşın tanı anında ektranodal tutulumu olan vakaların HSK'ları, olmayan hastalara göre daha kısaydı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (p:0,020).

Tablo 13. Hastalıksız Sağkalım Verileri (n:110)

		Toplam n	Olay N**	Ortalama	Ortanca	p*
Cinsiyet	erkek	55	11	102	120	
	kadın	55	7	140	155	0,121
Yaş	<45	79	6	146	155	
	≥45	31	12	73	47	0,0001
B semptom	var	74	12	132	-	
	yok	36	6	130	155	0,931
Sedimentasyon/saat	<50	63	7	122	-	
	≥50	47	11	123	155	0,249
B2mikroglubulin (n:75)	>N	29	5	109	-	
	N	46	5	157	-	0,171
Evre	I	10	1	133	-	
	II	54	4	135	155	
	III	31	6	131	-	0,009
	IV	15	7	75	47	
Tutulan alan (n:102)	1-3	68	8	130	155	
	≥4	34	8	117	-	0,186
Mediyastinal Tutulum	var	57	11	118	155	
	yok	53	7	138	-	0,402
Ekstranodal Tutulum	var	22	7	90	-	
	yok	88	11	137	155	0,020
Risk grubu	EvreI-II iyi	39	2	138	-	
	Evre I-II kötü	31	3	147	-	0,005
	Evre III-IV	40	13	98	155	
IPS	0	17	2	152	155	
	1	42	4	129	-	
	2	28	2	115	120	0,0001
	3	10	1	52	-	
	4	6	4	12	18	
	5	7	5	54	28	
IPS	1-3	97	9	142	155	
	≥4	13	9	40	19	0,0001
Nüks	hayır	74	6	153	155	
	evet	36	12	82	97	0,0002
Relaps süresi (n:36)	≤12ay	10	3	6	-	
	>12ay	26	9	101	120	0,0009
Hastalıksız Sağkalım		110	18	129	155	

*Log Rank test ** realaps süresi için olay sayısı n:12, B2mikroglubulin için olay sayısı n: 10, tutulan alan sayısı için olay sayısı n:16

Hastalar risk gruplarına göre 3 grup olarak ayrıldığında evre I-II olumlu risk grubu ile evre I-II olumsuz risk grubu arasında beklenenlerin tersine HSK'da bir artma var gibi görülmüşse de evre III-IV veya evre IIB ve ilave olarak büyük mediastinal kitlesinin olması veya ektranodal tutulumun olduğu vakalardan oluşan III. risk grubunda HSK diğer 2 gruba göre düşüktü ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p:0,005$). Önemli olarak IPS skoru attıkça HSK azalmakta idi ve fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p:0,0001$). Daha önemli olarak da olgular IPS skoru 3 ve az olanlarla 4 ve üzerinde risk faktörü olanlar kıyaslandığında HSK farkı daha belirgin hale gelmekteydi. 1-3 risk faktörü olan hastalarda HSK ortalama 142 ay iken 4 ve üzerinde olan grupta ise 40 ay olarak saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p:0,0001$).

Hastaların ilk tedavisinden sonra nüks olup olmamasına göre ayırdığımız gruplarda, nüks olan hastalarda HSK, nüks olmayanlara göre belirgin azdı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p:0,0002$). Hastaların 12 aydan kısa relaps süresi olanlarda, 12 aydan daha uzun sürede relaps olanlara göre HSK'ları daha kısaydı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p:0,0009$).

Toplam 110 hasta için yapılan genel sağkalım (GSK) analizinde, cinsiyete göre kadınlarda GSK daha uzun görünse de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (tablo 14). 45 yaş üstü hastalarda GSK azalmaktaydı ve bu fark IPS gibi istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p:0,0001$). Diyafragma lokalizasyonuna göre diyafragma altında lokalize olan olguların GSK'sı en düşük, diyafragma üstünde lokalize olanların GSK'sının en yüksek olduğu görünse de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. B semptomu olan hastalarda GSK'ları, B semptomu olmayanlara göre daha kısa saptandı fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Sedimentasyon hızı 50 ve üzerinde olan grupta GSK, 50'den az olan gruba göre daha yüksek görünse de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Hastaların evresi ilerledikçe GSK azalmış bulundu ve fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p:0,004$). Tutulan lenf nodu alanlarının sayısına göre 1-3 lenf nodu bölgesi tutulanların GSK'ları, 4 ve üzerinde lenf nodu tutulumları olanlardan daha uzun olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Mediastinal tutulum olan hastaların beklenenlerin tersine GSK'ları, mediastinal kitlesi olmayanlara göre daha yüksek saptandı fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Tanı anında

ekstranodal tutulum olan vakaların GSK'ları, olmayan hastalara göre daha kısa idi ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (p:0,031).

Tablo 14. Genel Sağakalım Verileri (n:110)

		Toplam n	Olay N**	Ortalama	Ortanca	p*
Cinsiyet	erkek	55	11	108	124	
	kadın	55	7	161	198	0,068
Yaş	<45	79	6	169	198	
	≥45	31	12	81	80	0,0001
Lokalizasyon (n:102)	Diyafragma	10	1	124	124	
	Altı					
	Diyafragma	57	8	145	129	0,680
	Üstü					
	Diyafragma	35	7	137	-	
	altı ve üstü					
B semptom	var	74	12	140	-	
	yok	36	6	147	198	0,935
Sedimentasyon/saat	<50	63	7	126	129	
	≥50	47	11	149	198	0,335
Evre	I	10	1	137	-	
	II	54	4	161	198	
	III	31	6	138	-	0,004
	IV	15	7	82	80	
Tutulan alan (n:102)	1-3	68	8	145	129	
	≥4	34	8	125	-	0,138
Medistinal Tutulum	var	57	11	148	198	
	yok	53	7	144	-	0,530
Ektranodal Tutulum	var	22	7	98	-	
	yok	88	11	159	198	0,031
Risk grubu	Evre I-I I iyi	39	2	143	-	
	Evre I-II kötü	31	3	153	-	0,019
	Evre III-IV	40	13	123	129	
IPS	0	17	2	182	198	
	1	42	4	132	-	
	2	28	2	119	124	0,0001
	3	10	1	115	-	
	4	6	4	38	25	
	5	7	5	65	49	
IPS	1-3	97	9	165	198	
	≥4	13	9	55	25	0,0001
Nüks	hayır	74	6	182	198	
	evet	36	12	104	124	0,007
Relaps süresi (n:36)	≤12ay	10	3	106	129	
	>12ay	26	9	138	124	0,519
Toplam Sağakalım		110	18	150	198	

*Log Rank test ** relaps süresi için olay sayısı n:12, lokalizasyon ve tutulan alan sayısı için olay sayısı n:16

Hastaları risk gruplarına göre ayırdığımız 3 grup için GSK, evre I-II olumlu risk grubu ile evre I-II olumsuz risk grubu arasında beklenenlerin tersine GSK olumsuz

grupta biraz daha uzun idi. Evre III-IV veya evre 2B ve ek olarak büyük mediastinal kitlesinin olması veya ektranodal tutulumun olduğu ileri evre grubunda GSK diğer 2 gruba göre daha kısa idi istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p:0,019$). IPS'e göre skor attıkça GSK azalmış olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p:0,0001$). Ayrıca IPS'e göre olgular gruplandığında 1-3 risk faktörü olan olgularda GSK 4 ve daha fazla risk faktörü olan olgulara göre çok daha önemli şekilde uzun bulundu. 165 aya karşı 55 ay olarak saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p:0,0001$).

Hastaların ilk tedavisinden sonra nüks olup olmamasına göre ayırdığımız gruplarda, nüks olan hastalarda GSK, nüks olmayanlara göre belirgin kısaydı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p:0,007$). Hastaların relapsı 12 aydan kısa sürede olmuşsa GSK relapsı bir yıldan daha sonra olanlara göre kısa idi fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Genel değerlendirme için 110 olgunun verileri yeterli idi ancak patolojik değerlendirme için uygunluğu gözden geçirildiğinde (örneklere patoloji arşivinde ulaşılamaması, daha önceki değerlendirmeler nedeni ile dokunun küçülmesi-bitmesi-doku fiksasyon hataları, vs) olguların 82'sinin doku örnekleri PRAME analizi için yeterli bulundu. PRAME analizi IHK ve RT-PCR yöntemleri ile yapıldı. IHK ile olguların 15'inde RT-PCR ile 8'inde PRAME ekspresyonu saptandı.

IHK olarak PRAME analizi yapılan 82 olgunun yaş dağılımları incelendiğinde PRAME pozitif grubun yaş ortalaması farklı bulunmadı (tablo15). Laboratuvar verileri değerlendirildiğinde PRAME pozitif grubun Lokosit, Lenfosit, Albumin ve Hemoglobin ortalama değerleri negatif gruba göre daha yüksekti fakat Hemoglobin haricindekilerde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p:0,011$). Sedimentasyon ortalaması için PRAME pozitif olgularda daha düşük saptandı fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Klinik olarak ise tutulan alan sayısı ortalaması pozitif boyananlarda daha yüksek, IPS ortalaması ise daha düşüktü fakat her ikisinde de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

RT-PCR olarak bu 82 hastanın yaş dağılımlarında RT-PCR pozitif grubun negatif gruba göre küçük bir ortalama yaş üstünlüğü vardı fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (tablo 16). Laboratuvar değerlerine göre pozitif grubun Lokosit, Lenfosit ve sedimentasyon ortalama değerleri negatif gruba göre daha yüksekti fakat

istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Hemogloblin ve Albumin ortalaması için pozitif boyananlarda daha düşük saptandı fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Klinik olarak ise tutulan alan sayısı ve IPS ortalaması pozitif boyananlarda daha yüksekti fakat her ikisinde de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Tablo 15. IHK ile PRAME Çalışılan 82 Olguda Demografik ve Klinik Veriler

		Ortanca	Alt -Üst	Ortalama±SS	P
Yaş	negatif	33	15-71	35,2±14,1	0,952
	pozitif	32	19-69	36,0±15,5	
	Toplam	33	15-71	35,3±14,3	
Lokosit /mm ³	Negatif	8800	1770-18200	8553±3615	0,881
	Pozitif	8300	4000-29400	9662±6110	
	Toplam	8745	1770-29400	8756±4158	
Hemogloblin g/dl	Negatif	11.8	8-16	11,5±1,96	0,011
	Pozitif	12.9	9-16	13,1±2,10	
	Toplam	12	8-16	11,8±2,07	
Lenfosit/mm ³	Negatif	1650	220-2800	1542±658	0,986
	Pozitif	1600	1100-2300	1598±378	
	Toplam	1630	220-2800	1552±615	
Albumin g/dl	Negatif	4,10	1,60-5,30	4,01±0,65	0,460
	Pozitif	4,20	3.10-5.10	4,19±0,58	
	Toplam	4,10	1,60-5,30	4,04±0,64	
Sedimentasyon/saat	Negatif	40,75	2-123	46,8±29,9	0,115
	Pozitif	31	2-88	32,7±23,1	
	Toplam	39,25	2-123	44,2±29,2	
Tutulan alan sayısı (n:76)	Negatif	3	1-6	3,11±1,32	0,816
	Pozitif	3	1-6	3,40±1,80	
	Toplam	3	1-6	3,16±1,41	
IPS	Negatif	1	0-6	1,78±1,45	0,828
	Pozitif	2	0-5	1,60±1,29	
	Toplam	1	0-6	1,74±1,42	

IHK ile PRAME erkeklerde kadınlardan daha fazla saptandı (% 23,3 karşı % 12,8). Buna karşın RT-PCR ile PRAME ekspresyonu kadın ve erkeklerde benzer oranda saptandı (E/K 4/4). Ancak her iki değerlendirmede de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (tablo 17). IHK olarak 45 yaş altı ve üstü hastalarda PRAME ekspresyonu benzer idi (<45/≥45 %18 karşı % 19). Buna karşı RT-PCR ile saptanan PRAME ekspresyonu 45 yaş ve üzerinde daha fazla idi (<45/≥45 %6,6/19). Her iki kıyaslamada da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Diyafragma altı ve üstü tutulumu olan hastalarda, PRAME ekspresyonu IHK ile saptanan PRAME pozitifliğinde daha fazla iken (% 26,9) RT-PCR ile saptanan PRAME diyafragma altı tutulumu olan hastalarda daha yüksek bulundu (% 16,7) ancak bunlar istatistiksel olarak farklı bulunmadı. IHK

olarak B semptom varlığı PRAME ekspresyonu olan olgularda hem IHK hem RT-PCR ile PRAME pozitif olgularda daha fazla oranda saptandı (Sırası ile % 19,6 karşı % 15,4 ve % 12,5/3,8). Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Tablo 16. RT-PCR ile PRAME Çalışılan 82 Olguda Demografik ve Klinik Veriler

		Ortanca	Alt-Üst	Ortalama±SS	p
Yaş	Negatif	32	15-71	34,4±13,9	0,077
	Pozitif	43	20-69	44,3±15,7	
	Toplam	33	15-71	35,3±14,3	
Lokosit /mm ³	Negatif	8550	1770-18200	8409±3543	0,128
	Pozitif	9826	4700-29400	11961±7488	
	Toplam	8745	1770-29400	8756±4158	
Hemoglobin g/dl	Negatif	12	8-16	11,8±2,11	0,622
	Pozitif	11,4	9-15	11,5±1,71	
	Toplam	12	8-16	11,8±2,07	
Lenfosit/mm ³	Negatif	1640	220-2800	1537±614	0,584
	Pozitif	1630	581-2800	1697±645	
	Toplam	1630	220-2800	1552±615	
Albumin g/dl	Negatif	4,11	1.60-5.30	4,04±0,66	0,833
	Pozitif	4,00	3.60-4.70	4,07±0,38	
	Toplam	4,10	1,60-5,30	4,04±0,64	
Sedimentasyon/saat	Negatif	38	2-123	43,5±29,9	0,238
	Pozitif	49.5	19-88	51.0±21.7	
	Toplam	39,25	2-123	44,2±29,2	
Tutulan alan sayısı (n:76)	Negatif	3	1-6	3,15±1,36	1,000
	Pozitif	2,75	1-6	3,31±1,90	
	Toplam	3	1-6	3,16±1,41	
IPS	Negatif	1	0-6	1,65±1,36	0,077
	Pozitif	2,5	0-5	2,63±1,68	
	Toplam	1	0-6	1,74±1,42	

IHK olarak Lokositoz olması, Hemoglobinin 10,5 mg/dl'den fazla olması, Lenfosit sayısının 600 mm³'den fazla olması, Albuminin 4 g/dl'den fazla olması, Sedimentasyon hızının 50/saat'ten az olması, Beta2 mikroglobulinin normal değerin üzerinde olması, bunlara karşılık gelen gruplar ile kıyaslandığında daha yüksek PRAME ekspresyonu gösterdi fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. RT-PCR olarak lokositoz olması, anemi ve hipoalbuminemi, yüksek sedimentasyon hızı bunlara karşılık gelen gruplarla kıyaslandığında daha yüksek PRAME ekspresyonu gösterdi fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Evrelere göre kıyaslandığında IHK ile saptanan PRAME en fazla evre III hastalıkta saptandı (% 25), fakat evre 4'de boyanma oranı % 9,1'di. RT-PCR ile PRAME pozitifliği en fazla evre IV hastalıkta saptandı (% 18,2) ancak evreler arasında

PRAME pozitifliği farklı değildi. IHK olarak 4 ve daha fazla lenf nodu tutulumu olan hastalarda PRAME pozitifliği, 1-3 lenf nodu tutulan alanı olan hastalara göre daha fazla saptandı (% 21,4 karşı % 18,8).

Tablo 17. PRAME IHK ve RT-PCR Verileri İle Hasta Özelliklerinin Karşılaştırılması

		Prame IHK		p	Prame RT-PCR		P
		Negatif N	Positif n(%)		Negatif n	Positif n(%)	
Cinsiyet	Kadın	34	5(12,8)	0,175	35	4(10,3)	0,587
	erkek	33	10(23,3)		39	4(9,3)	
Yaş	<45	50	11(18)	0,575	57	4(6,6)	0,111
	≥45	17	4(19)		17	4(19)	
Lokalizasyon (n:76)	Diyafragma altı	5	1(16,7)	0,525	5	1(16,7)	0,790
	Diyafragma üstü	37	7(15,9)		40	4(9,1)	
	Diyafragma alyı ve üstü	19	7(26,9)		24	2(7,7)	
B semptom	yok	22	4(15,4)	0,765	25	1(3,8)	0,425
	Var	45	11(19,6)		49	7(12,5)	
Lokosit/mm ³	<15000	63	14(18,2)	0,646	70	7(9,1)	0,410
	≥15000	4	1(20)		4	1(20)	
Hemoglobin g/dl	≥10.5	49	13(21)	0,226	56	6(9,7)	0,629
	<10.5	18	2(10)		18	2(10)	
Lenfosit/mm ³	≥600	56	15(21,1)	0,092	64	7(9,9)	0,709
	<600	11	0(0)		10	1(9,1)	
Albumin g/dl	≥4	40	9(18,4)	0,983	45	4(8,2)	0,409
	<4	27	6(18,2)		29	4(12,1)	
Sedimentasyon/saat	<50	37	10(21,3)	0,304	44	3(6,4)	0,206
	≥50	30	5(14,3)		30	5(14,3)	
B2mikroglobulin (n:54)	>N	17	6(26,1)	0,766	21	2(8,7)	0,488
	N	24	7(22,6)		27	4(12,9)	
Evre	I	6	1(14,3)	0,697	7	0(0)	0,637
	II	33	7(17,5)		36	4(10)	
	III	18	6(25)		22	2(8,3)	
	IV	10	1(9,1)		9	2(18,2)	
*Tutulan alan sayısı (n:76)	1-3	39	9(18,8)	0,777	44	4(8,3)	0,513
	≥4	22	6(21,4)		25	3(10,7)	
Mediastinal Tutulum	yok	33	5(13,2)	0,204	35	3(7,9)	0,442
	Var	34	10(22,7)		39	5(11,4)	
Ekstranodal Tutulum	Yok	54	13(19,4)	0,449	62	5(7,5)	0,157
	Var	13	2(13,3)		12	3(20)	
Risk grubu	Evre I-II iyi	23	6(20,7)	0,743	28	1(3,4)	0,227
	Evre I-II kötü	20	3(13)		21	2(8,7)	
	Evre III-IV	24	6(20)		25	5(16,7)	
IPS	1-3	59	14(19,2)	0,480	68	5(6,8)	0,039
	≥4	8	1(11,1)		6	3(33,3)	
Nüks	Hayır	43	11(20,4)	0,361	49	5(9,3)	0,558
	Evet	24	4(14,3)		25	3(10,7)	
Yanıt şekli	Tam	47	11(19)	0,539	53	5(8,6)	0,430
	Kısmi	20	4(16,7)		21	3(12,5)	
Relaps süresi (n:28)	≤12ay	6	0(0)	0,470	6	0(0)	0,611
	>12ay	19	3(13,6)		20	2(9,1)	

* Tutulan alan IHK 14 hastada, PCR için 7 hastada pozitif.

Benzer şekilde RT-PCR ile PRAME pozitif olgularda 4 ve üstü lenf nodu tutulan alanı olan grupta daha yüksek bir pozitiflik mevcuttu (≥ 4 /1-3 % 8,3/10,7). Her iki sonuçta istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. IHK ile PRAME pozitif olgularda mediastinal tutulum daha fazla idi (% 22,7 karşı % 13,2). Benzer şekilde RT-PCR ile PRAME saptanan olgularda mediastinal tutulumun daha fazla idi (tutulum olan /olmayan % 11,4/7,9). Her iki sonuçta istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. IHK ile PRAME saptananlarda ektranodal tutulum olmaması oranı fazlaydı (% 19,4 karşı % 13,3). Buna karşın RT-PCR ile PRAME saptanan olgularda ektranodal tutulum daha fazla idi (tutulum olan/olmayan % 20/7,5). Ancak farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

IHK ile PRAME saptanması risk gruplarında benzer bulundu. RT-PCR ile PRAME saptanan olgularda ise yüksek riskli gruplarda PRAME daha fazla eksprese olmaktaydı (Grup 1/2/3: % 3,4/8,7/16,7). Ancak farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. IHK ile PPRAME saptanan olgularda IPS 1-3 olan hastalarda, 4 ve daha fazla risk olan hastalardan daha fazla idi (%19,2 karşı % 11,1). Buna karşı RT-PCR ile PRAME saptananlarda IPS daha yüksek idi (≥ 4 /1-3 % 33,3/6,8) ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştu (p:0,039).

IHK ile PRAME saptananlarda nüks daha azdı buna karşın RT-PCR ile PRAME saptananlarda nüks daha yüksekti (nüks olan/olmayan % 10,7/9,3). Her iki sonuçta istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. IHK ile PRAME saptananlarda tam yanıt, kısmi yanıtli hastalara göre daha fazlaydı (% 19 karşı % 16,7). Buna karşın RT-PCR ile PRAME saptananlarda kısmi yanıt daha yüksekti (kısmi/tam % 12,5/8,6). Her iki sonuçta istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. IHK ile PRAME saptananlarda relaps daha geç idi (% 13,6 karşı %0). Benzer şekilde RT-PCR ile PRAME saptananlarda relaps daha geç idi ($>12/ \leq 12$ % 9,1/0) fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. PRAME IHK ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması tablo 17'de verilmiştir.

PRAME çalışılan 82 hasta için yapılan HSK analizinde RT-PCR pozitifliği saptanan hastaların, negatif hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p:0,0005) (tablo 18). IHK ise pozitif boyanmanın, boyanmamaya göre HSK'da bir avantajı olsa da (118 aya karşı 61 ay) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (şekil-5 ve 6).

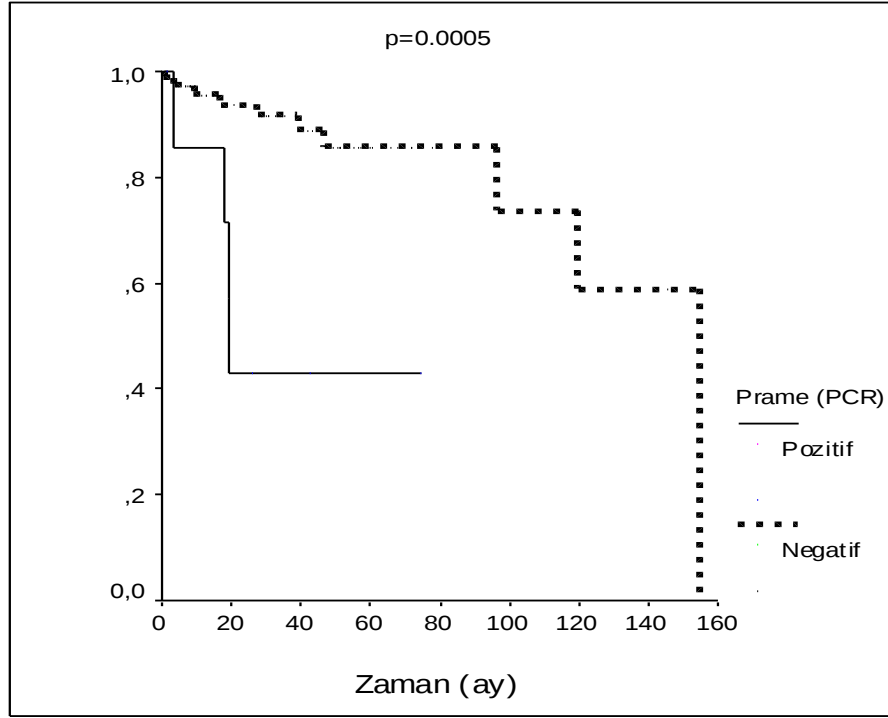
Tablo 18. PRAME Çalışılan Olgularda Hastalısız Sağakalım Verileri

		Toplam n	Olay N**	Ortalama	Ortanca	p*
PCR	(-)	74	10	124	155	0,0005
	(+)	8	4	40	20	
IHK	(-)	67	12	118	155	0,800
	(+)	15	2	61	-	
Cinsiyet	erkek	43	9	100	120	0,132
	kadın	39	5	128	155	
Yaş	<45	61	5	135	155	0,0001
	≥45	21	9	37	47	
B semptom	var	56	10	106	120	0,467
	yok	26	4	131	155	
Sedimentasyon/saat	<50	47	6	115	120	0,608
	≥50	35	8	115	155	
B2mikroglobulin (n:54)	>N	23	3	109	-	0,426
	N	31	4	119	-	
Evre	I	7	1	127	-	0,007
	II	40	2	136	155	
	III	24	5	107	-	
	IV	11	6	72	47	
Tutulan alan sayısı(n:76)	1-3	48	6	125	120	0,080
	≥4	28	7	92	97	
Mediyastinal Tutulum	Var	44	9	113	155	0,500
	Yok	38	5	118	120	
Ekstranodal Tutulum	Var	15	5	88	-	0,066
	Yok	67	9	124	155	
Risk grubu	Evre I-II iyi	29	2	135	-	0,050
	Evre I-II kötü	23	2	114	120	
	Evre III-IV	30	10	96	97	
IPS	0	13	2	136	155	0,0001
	1	29	2	132	-	
	2	23	2	114	120	
	3	8	1	50	-	
	4	3	2	18	18	
	5	6	5	41	20	
IPS	1-3	73	7	129	155	0,0001
	≥4	9	7	36	20	
Nüks	hayır	54	5	141	155	0,005
	Evet	28	9	86	97	
Yanıt şekli	Tam	58	8	86	97	0,905
	kısmi	24	6	119	155	
Relaps süresi(n:28)	≤12ay	6	1	7	-	0,035
	>12ay	22	8	102	120	
Overall		82	14			

*Log Rank test ** B2mikroglobulin için olay sayısı n:7, tutulan alan sayısı için n:13,relaps süresi için olay sayısı n:9.

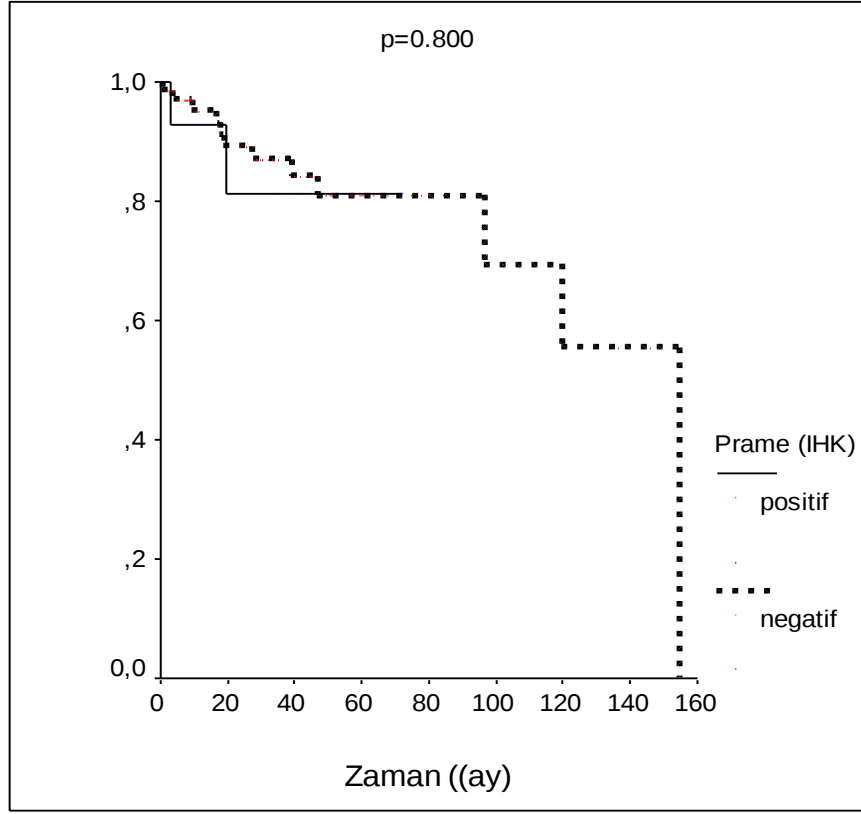
82 hasta için yapılan HSK analizinde, cinsiyete göre kadınlar daha avantajlı görülmüş istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Yaş dikkate alındığında 45 yaş üstü hastalarda HSK azalmaktaydı ve bu fark IPS gibi istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p:0,0001). B semptomlarının olduğu hastalarda HSK'ları, B semptomu

olmayanlara göre daha yüksek saptandı fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



Şekil 5. Prame (RT-PCR) ekspresyonuna göre hastalıksız sağkalım eğrileri

HSK, ESH düşük ve yüksek olan olgular arasında fark bulunmadı. Beta 2 mikroglobulin düzeyi yüksek olan hastalarda HSK, normal Beta 2 mikroglobulin olan hastalardan daha kısaydı fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 6. Prame (IHK) ekspresyonuna göre hastalıksız sağkalım eğrileri

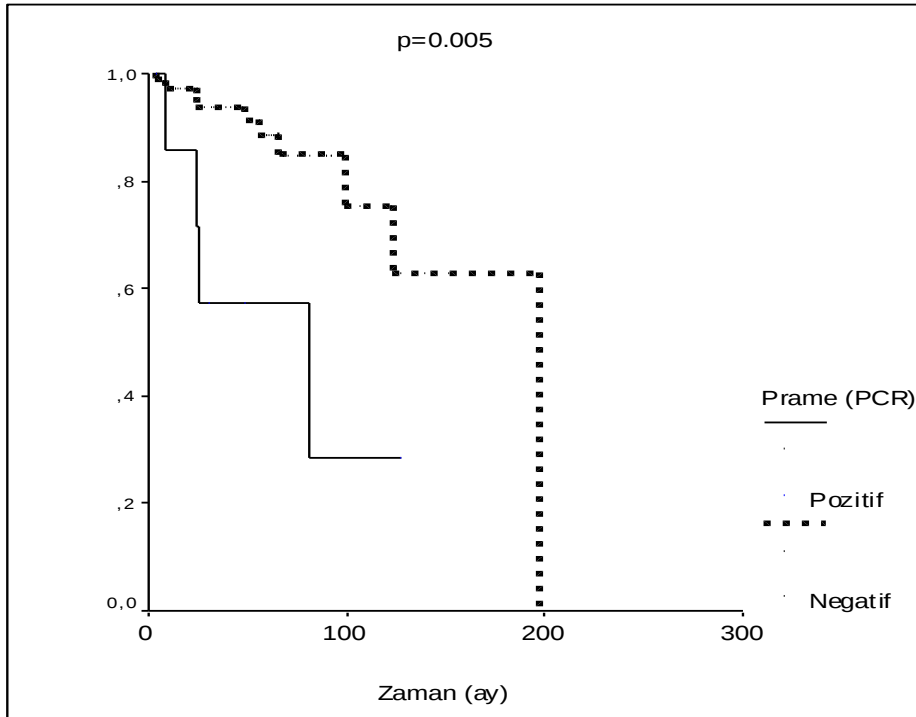
Hastalarda evre yükseldikçe HSK'ları azalmaktaydı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p:0,007$). Tutulan lenf nodu alanlarının sayısına göre 1-3 lenf nodu bölgesi tutulanların HSK'ları, 4 ve üzeri lenf nodu tutulumları olanlardan daha yüksek görünse de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Mediastinal tutulum olmayan hastaların HSK'ları, mediastinal kitlesi olanlara göre daha yüksek saptandı fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Tanı anında ektranodal tutulum olan vakaların HSK'ları, ektranodal tutulum olmayan hastalara göre daha kısa idi ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Risk grupları kıyaslandığında evre I-II olumlu risk grubunda HSK en uzun, III. risk grubunda en kısa olmak üzere risk artışı ile uyumlu olarak HSK'da azalma saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p:0,050$). IPS'e göre skor attıkça HSK azaldı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p:0,0001$). Ayrıca IPS'e göre 1-3 skoru olan hastalarda HSK IPS 4 ve üzeri olan gruba göre daha yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p:0,0001$).

Nüks olan hastalarda HSK, nüks olmayanlara göre belirgin kısaydı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p:0,005$). Tam yanıt verenlerde beklenenlerin tersine HSK, kısmi yanıt verenlere göre daha kısaydı fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Hastaların 12 aydan kısa relaps süresi olanlarda, 12 aydan daha uzun sürede relaps olanlara göre HSK'ları daha kısaydı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p:0,035$).

PRAME çalışılan toplam 82 hasta için yapılan GSK analizinde RT-PCR ile PRAME pozitif hastaların, negatif hastalara göre GSK avantajı vardı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p:0,005$) (şekil 7). IHK ile PRAME saptananlarda GSK avantajı olsa da (149 aya karşı 79 ay) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (şekil-8).

Toplam 82 hasta için yapılan GSK analizinde, kadınlarda GSK daha avantajlı görünse de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (tablo 19). 45 yaş üstü hastalarda GSK azalmaktaydı ve bu fark IPS gibi istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p:0,0001$). B semptomu olduğu hastalarda GSK, B semptomu olmayanlara göre daha uzun saptandı fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

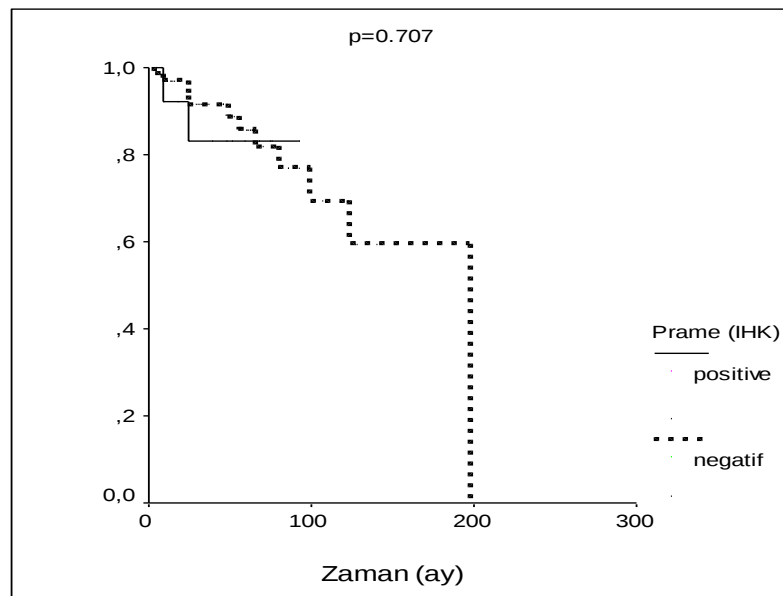


Şekil 7. Prame (RT-PCR) ekspresyonuna göre genel sağkalım eğrileri

ESH yüksek olan grupta GSK daha uzun görünse de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Beta 2 mikroglobulin normalin üstünde olan hastalarımızda GSK daha düşüktü fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Hastaların evresi arttıkça GSK'ları azalmaktaydı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p:0,007$). Tutulan lenf nodu alanlarının sayısına göre 1-3 lenf nodu bölgesi tutulanların GSK'ları, 4 ve daha fazla lenf nodu tutulumları olanlardan daha yüksek görünse de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Mediastinal tutulum olan hastaların beklenenlerin tersine GSK'ları, mediastinal kitlesi olmayanlara göre daha uzun saptandı ise de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Tanı anında ektranodal tutulum olan vakaların GSK'ları, olmayan hastalara göre daha kısaydı fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Risk gruplarına göre evre I-II olumlu risk grubunda GSK en uzun bulundu evre III--IV veya evre IIB ve ilave olarak büyük mediastinal kitlesinin olması veya ektranodal tutulumun olduğu vakalardan oluşan 3. risk grubunda beklenenlerin tersine evre I-II olumsuz risk grubuna göre GSK daha uzun idi fakat gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p:0,057$) IPS'e göre skor arttıkça GSK kısaltılmaktaydı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p:0,0001$). Ayrıca IPS'e göre IPS 1-3 olan olgularda 4 ve üzerinde risk olan hastalardan belirgin uzun bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p:0,0001$).



Şekil 8. Prame (IHK) ekspresyonuna göre genel sağkalım eğrileri

Nüks olan hastalarda GSK olmayanlara göre belirgin kısaydı fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Tam yanıt verenlerde beklenenlerin tersine GSK, kısmi yanıt verenlere göre daha düşüktü fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Tablo 19. PRAME Çalışılan Olgularda Genel Sağakalım Verileri

		Toplam n	Olay N**	Ortalama	Ortanca	p*
PRAME RT-PCR	(-)	74	10	156	198	0,005
	(+)	8	4	68	80	
PRAME IHK	(-)	67	12	149	198	0,707
	(+)	15	2	79	-	
Cinsiyet	Erkek	43	9	107	124	0,145
	kadın	39	5	160	198	
Yaş	<45	61	5	169	198	0,0001
	≥45	21	9	71	66	
B semptom	Var	55	10	116	-	0,800
	Yok	27	4	154	198	
Sedimentasyon/saat	<50	47	6	119	124	0,832
	≥50	35	8	151	198	
B2mikroglobulin(n:54)	>N	23	3	117	-	0,485
	N	31	4	121	-	
Evre	I	7	1	131	-	0,007
	II	40	2	178	198	
	III	24	5	117	-	
	IV	11	6	80	66	
Tutulan alan sayısı (n:76)	1-3	48	6	139	124	0,124
	≥4	28	7	103	-	
Mediyastinal Tutulum	Var	44	9	148	198	0,413
	Yok	38	5	125	-	
Ekstranodal Tutulum	Var	15	5	97	-	0,122
	Yok	67	9	156	198	
Risk grubu	Evre I-II iyi	29	2	139	-	
	EvreI-II kötü	23	2	120	124	0,057
	Evre III-IV	30	10	123	100	
IPS	0	13	2	173	198	0,0001
	1	29	2	138	-	
	2	23	2	118	124	
	3	8	1	112	-	
	4	3	2	53	25	
	5	6	5	52	25	
IPS	1-3	73	7	165	198	
	≥4	9	7	53	49	0,0001
Nüks	Hayır	54	5	179	198	
	Evet	28	9	108	124	0,083
Yanıt şekli	Tam	58	8	104	-	0,991
	Kısmi	24	6	151	198	
Toplam Sağakalım		82	14			

*Log Rank test ** B2mikroglobulin için olay sayısı n:7, tutulan alan sayısı için n:13

Toplam ve hastalıksız sağkalımı etkileyen bağımsız faktörlerin saptanmasında kullanılan çoklu regresyon (Cox Regresyon) analiz sonuçları tablo 20’ de görülmektedir. Yaş ve risk grubunun sağkalımı etkileyen bağımsız faktörler olduğu görülürken PRAME pozitifliğinin ölüm riskini arttırdığı (OR: 1,63 %95 GA:0,31-8,61) fakat anlamlı bir faktör olmadığı izlenmektedir.

Tablo 20. Toplam ve Hastalıksız Sağkalımı Etkileyen Bağımsız Faktörlerin Saptanmasında Kullanılan Çoklu Regresyon (Cox Regresyon) Analiz Sonuçları

	Toplam Sağkalım				Hastalıksız Sağkalım			
	B	OR	%95 GA	p	B	OR	%95 GA	p
Prame (IHK)	0,49	1,63	0,31-8,61	0,568	-0,30	0,74	0,15-3,70	0,716
Risk grubu								
Yok		Ref.				Ref.		
Düşük (F)	-0,07	0,93	0,12-7,06	0,947	0,47	1,61	0,22-11,98	0,644
Yüksek (3-4)	1,62	5,04	1,03-24,62	0,046	1,87	6,51	1,36-31,13	0,019
Yaş	0,09	,000	1,05-1,14	0,000	0,10	1,11	1,05-1,16	0,000
Prame (PCR)	1,28	3,58	0,89-14,48	0,074	0,90	2,47	0,67-9,06	0,174
Risk grubu								
Yok		Ref.				Ref.		
Düşük (F)	0,23	1,26	0,16-9,77	0,826	-0,25	0,78	0,10-5,85	0,810
Yüksek (3-4)	1,62	5,05	0,99-25,66	0,051	1,29	3,64	0,70-18,80	0,123
Yaş	0,10	1,11	1,05-1,16	0,000	0,09	1,10	1,05-1,14	0,000

OR: Odds Ratio, GA: Güven Aralığı, B: Katsayı

5. TARTIŞMA

HL, germinal merkez ve postgerminal merkez B hücrelerinden gelişen, inflamatuvar bir zeminde RS ve varyantı neoplastik hücrelerin bir kısmını içeren hücre kompozisyonuna sahip, heterojen bir tümör grubudur. Neoplastik hücrelerin morfolojisi, inflamatuvar zemindeki hücre kompozisyonunun farklılığına bağlı ve tümör hücrelerinin immunfenotipik görünümüne dayanılarak 2 büyük subgruba ayrılır.¹⁶ HL'da risk faktörleri; çevre ve yaşam tarzı, EBV enfeksiyonu, immunosupresyon, otoimmün hastalık ve genetikler.

Günümüzde malign tümörlerin yönetiminde pek çok bilinmeyen olmasına karşın birçok prognostik ve/veya prediktif faktörlerin hastalarda yüksek riskli grupların seçimi ve tedavinin buna dayanılarak yönlendirilmesi için kullanılmaktadır. HL'nın prognozunu belirleyen en önemli faktörler yaş, cinsiyet, tümör yükü, mediastinal bulky hastalık, evre, yaygın ektranodal yayılım, sistemik semptomlar, bazı anormal laboratuvar bulguları (ESH, ferritin, hemoglobin seviyesi, serum albumin, artmış lokositöz veya lenfositopeni), tedavi sonrası remisyon durumu, histopatoloji ve tutulan lenf nodu bölge sayısıdır.^{223,225-230,239,233-235} Bunların arasında tanı anındaki hastalık evresi ve "B" semptomu varlığı en önemli prognostik faktörler olarak görülmektedir. Bulky hastalık (>10 cm) son zamanlarda üçüncü bir prognostik faktör olarak kabul görmüştür.²²⁵

HL'da tanıdan sonraki doğal seyir hastalar arasında farklılıklar göstermektedir. HL aynı histolojik tipte, aynı evrede aynı yaş gruplarında bile farklı klinik gidiş gösterebilir. Bazı hastalar uzun süreler hastaliksız yaşarken bazılarında çok kısa sürede nüksler olmaktadır. Tümör büyüme hızı, invazyon ve metastaz yapma potansiyeli temelde bu farklılıkları oluşturmaktadır. HL'da tümör davranışını belirleyen özelliklerin saptanması hastaliksız ve toplam yaşam sürelerinin daha doğru ortaya konulmasını ve hastaların daha doğru tedavisini sağlayacaktır. Birçok çalışmada, daha intensif tedavilerden fayda görebilecek kişileri tanımlamada veya ilk relaps için yüksek riskli kişileri tanımlamak için prognostik faktörler kullanılmıştır ve International Prognostic Score (IPS) bunlardan en kolay uygulanabilir olanıdır.²³⁶

Hodgkin Lenfoma kombinasyon tedavinin etkin olduğunun gösterildiği ilk hastalık olup bugün malign tümörlerin içinde en iyi sonuçların alındığı hastalıkların

başında gelmektedir. Ancak tedaviye rezistan hastalıkta tedavi seçenekleri sınırlıdır ve bu olgularda yeni tedavi stratejileri gelişmesi için yeni hedeflerin tanımlanması gerekmektedir. Yeni kemoterapetik ilaç ve bunların kombinasyonları ile başarılı sonuçlar alınmaktadır. Ancak pek çok malign tümörde olduğu gibi HL'da da immunoterapi çekici bir seçenek gibi görünmektedir. İmmunoterapi için temel konu ideal hedefin belirlenmesidir ve bu hedef tümör hücrelerinde eksprese edilirken normal dokularda eksprese edilmemelidir. Bu perspektifte bakıldığında PRAME, otolog STL tarafından tanındığının belirlenmesinden beri tümör immunoterapisi için umut verici bir aday olmuştur.^{1,2}

HTA, tümör immunolojisinde ilgi çeken alanların başında gelmektedir. PRAME HTA ailesinin önemli bir üyesidir. 22. kromozomda (22q11.22) 509 aminoasitten oluşan bir proteini kodlar.^{4,5} Normal dokularda oldukça düşük eksprese olmaktadır. Normal testiste görece daha yüksek oranda eksprese olurken çok daha az seviyede endometriyum, adrenal bezler ve overde saptanabilir.^{2,6} PRAME geninin fonksiyonu net değildir ve bugüne kadar yapılan çalışmalarda birbirine zıt sonuçların da saptanması nedeniyle net olarak fonksiyonu anlaşılamamıştır. PRAME, RA tarafından uyarılan diferansiyasyon, büyümenin durması ve apoptozisi bloke ederek etkisini gösterir.^{2,8} Lösemik hücrelerde apoptozis ile ilişkili gen ekspresyonunda azalma, lösemik hücrelerin yaşam süresinin uzaması ve miyeloid farklılaşmada inhibisyon bildirilmiştir.^{10,11} Bunların tersine lösemik hücrelerde PRAME'in in- vivo tümör gelişimini azalttığı ve lösemik hücre serilerinde kaspaz bağımsız hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir.^{10,12}

PRAME bir tümör antijeni olarak birçok tümörde eksprese olduğu gösterilmiş olmakla beraber HL'da PRAME ekspresyon ile ilgili bilgi çok azdır. Bu çalışma ile HL'da PRAME ekspresyonunu araştırmak, HL'da bilinen prognostik faktörlerle (sedimentasyon, lökosit, lenfosit, hemoglobin, albumin, beta 2 mikroglobulin, nodal alan sayısı ve lokalizasyonu, bulky hastalık, mediastinal kitle boyutu, ektranodal hastalık durumu, International Prognostic Score (IPS), yanıt durumu ve B semptomu varlığı, kemoresistansla ve/veya tedaviye yanıt ile ilişkisini, hastalıksız sağkalım, genel sağkalıma etkisini saptamak amaçlanmıştır. Ayrıca HL'da PRAME'in immun tedavide bir hedef molekül olarak kullanılabilirliğinin saptanması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada parafinli dokudan PRAME ekspresyonu hem RT-PCR ile hem de IHK ile çalışılmıştır. Şimdiye kadar yapılan çalışmaların yaklaşık olarak hepsinde taze doku kullanılmış ve yöntem olarak RT-PCR tercih edilmiştir. Bu çalışmada parafinli dokular kullanılmış ve parafinli dokuların PRAME analizinde RT-PCR yöntemi için kullanılabilir olup olmadığının saptanması amaçlanmıştır. Görece az görülen ve uzun süreli yaşama potansiyeli olan HL olgularında bu dokuların kullanılabilir olup olmadığının gösterilmesi amaçlanmıştır. Aynı örneklerle IHK yöntemi de uygulanmış olup, RT-PCR ile IHK yöntemlerinin kıyaslanabilir olup olmadığının saptanması da amaçlanmıştır. IHK gibi kolay uygulanabilir bir yöntemle kıyaslanarak da PRAME analizi için pratik, kolay ve ucuz yöntemin uygulanabilir olup olmadığı araştırılmak istenmiştir.

Çalışmada, 1998 ve 2012 yılları arasında takip edilen ve verilerine ulaşılabilen HL'lı toplam 110 hasta çalışmaya alınmıştır.

Toplam 110 hasta için yapılan HSK analizinde, kadın cinsiyet, B semptomu olmaması, Beta2 mikroglobulin normal olması, 1-3 tutulan lenf nodu sayısı olması, mediastinal kitle olmaması, nüks olmaması beklendiği gibi daha uzundu fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. GSK analizinde, kadın cinsiyet, diyafragma üstü lokalizasyon, B semptomu olmaması, 1-3 tutulan lenf nodu sayısı olması, relaps süresi 12 aydan uzun olanlar beklendiği gibi daha uzundu fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bunun nedeni olgu sayısının görece az olması ya da retrospektif çalışmalarda gözlenen kayıt problemleri ve yıllar içinde kullanılan laboratuvar ve/veya görüntüleme yöntemlerindeki farklılıklarla ilişkili olabilir. Beklendiği gibi 45 yaş üstü, ileri evre hastalık, ektranodal tutulum, yüksek risk grubu, yüksek IPS skoru ve nüks olması ile relaps süresinin ≤ 12 aydan kısa olması durumlarında HSK daha kısa bulundu ve her bir faktör için farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Yine beklendiği gibi 45 yaş üstü, ileri evre hastalık, ektranodal tutulum, yüksek risk grubu, yüksek IPS skoru ve nüks olması durumlarında GSK daha kısa bulundu ve her bir faktör için farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

110 olgunun 28'ine ait doku örnekleri çalışma için yeterli olmadığı için PRAME analizleri 82 olguda gerçekleştirilebilmiştir. Immunhistokimyasal PRAME analizinde toplam 15 hastada (% 18,3) PRAME ekspresyonu saptanmıştır. PRAME boyanma şiddeti değerlendirildiğinde 5 (%6,1) hastada (++), 10 (% 12,2) hastada(+) boyanma

saptandı, IHK olarak PRAME pozitif saptanan olguların 4'ü MS, 9'u NS, 1'i NLP, 1'i LF tip HL idi. RT-PCR ile PRAME olguların 8'inde (% 9,8) saptanmıştır. Kantitatif değerlendirmede PRAME 1,52 kat-244,51 kat arasında değişmek üzere geniş bir dağılım göstermiştir. RT-PCR ile daha az örnekte PRAME saptanmasının nedeni dokuların fiksasyon ya da parafinlenme aşamalarında RNA kaybı ile ilgili olabilir. Aslında RT-PCR yönteminin daha duyarlı ve çok daha az miktarlardaki antijenik yapıları daha hassas şekilde gösterebilme potansiyeline karşın IHK ile daha fazla ekspresyon saptanması olası RNA kaybı ile açıklanabilir. Ayrıca IHK ile HL doku örneklerinde başlıca RS hücrelerinde ve histiyositlerde PRAME saptanmıştır. Pek çok malign tümörün görece homojen hücrelerden oluşmasına karşın HL'da heterojen hücrelerin bulunması da iki yöntemle saptanan farklı ekspresyonları açıklayabilir. Özellikle RS hücreleri ve histiyositlerde PRAME saptanmasından dolayı HL'da taze dokularda PRAME çalışması yapılması planlanırsa mikrodiseksiyon ile bu hücrelerin ayrılarak PRAME çalışılmasının yararlı olabileceği kanısına varılmıştır.

IHK ile PRAME saptanan olguların 4'ünde RT-PCR ile PRAME saptandı, 4 olguda ise RT-PCR ile PRAME saptanmışken IHK ile PRAME saptanmadı. RT-PCR ile PRAME saptanan olguların 3'ü MS, 4'ü NS, 1'i LF tip HL iken 1'i klasik tip sınıflandırılmayan HL idi. Özetle RT-PCR ile PRAME saptanan olgularda subtipte belirgin farklılık yok iken IHK ile PRAME saptanan olguların % 60'ı NS tipte idi. Bunun klinik önemini bilmemekteyiz ancak NS tipte PRAME daha fazla ise özellikle bu olgularda immunoterapi için PRAME'in hedef olabileceği düşünülebilir.

IHK olarak PRAME ekspresyonu olan ve olmayan olgular yaş, lökosit, lenfosit, albumin, ve tutulan alan sayısı, sedimantasyon ve IPS ortalamaları bakımından farklı bulunmadı. RT-PCR ile PRAME pozitifliği saptanan ve saptanmayan olgularda da yaş, lökosit, lenfosit, hemoglobin, albumin sedimantasyon, tutulan alan sayısı ve IPS ortalamaları farklı bulunmadı. RT-PCR ile PRAME saptanan olgularda yaş daha ileri idi ve IPS skoru daha yüksek idi. Her ne kadar 0,077 p değeri ile yaş parametresi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ise de PRAME pozitif olgularda yaş ortalaması 43 iken negatif olgularda 32 iken farkın anlamsız olması PRAME pozitif olgu sayısının az olması ile ilgili olabilir. Diğer taraftan RT-PCR ile ekspresyon saptanan olguların üçte birinde IPS 4'ten fazla iken PRAME negatif olgularda bu oranın yalnızca % 6 olması istatistiksel olarak çok anlamlı bulunmuştur (p:0,039). Bu 2 güçlü prognostik parametre

açısından farklılık olması RT-PCR ile saptanan PRAME ekspresyonunun HL olgularında kötü prognoz belirleyici bir faktör olabileceğini telkin etmektedir. Aslında, istatistiksel fark saptanmasa da, RT-PCR ile de PRAME saptanan olgularda IPS ortalaması 2,5 iken negatif olanlarda 1 saptanmıştır. Yani her 2 yöntemde de PRAME ekspresyonu kötü IPS ile ilişkilidir. RNA kayıpları olasılığı göz önünde tutularak gerçek anlamda PRAME ekspresyonu saptanabilseydi sonuçlar daha çarpıcı olabilirdi kanısına varıldı.

RT-PCR ile PRAME çalışılan 82 hasta için yapılan HSK analizinde PRAME negatif hastalarda belirgin HSK avantajı vardı ve istatistiksel olarak fark anlamlı bulundu ($p:0,0005$). IHK ile PRAME çalışılan 82 hasta için yapılan HSK analizinde ise PRAME negatif hastalarda HSK 118 ay iken PRAME pozitif olgularda 61 ay idi ancak istatistiksel fark bulunamadı ($p:0,800$) . Aynı şekilde yapılan GSK analizinde RT-PCR ile PRAME pozitif hastaların, negatif hastalara göre GSK avantajı vardı ve istatistiksel olarak anlamlı iken IHK ile PRAME saptananlarda GSK avantajı olsa da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Bu RT-PCR ile HL'da PRAME pozitif grupların daha kısa bir hastalıklı yaşamını göstermesi bakımından çok çarpıcıdır. Ayrıca istatistiksel olarak farkın anlamlı bulunduğu bu grupta PRAME varlığının HL'da kötü prognozla ilgisini bir kez daha göstermiştir. IHK ile boyanma bir HS farkı oluşturmuştur. Fakat muhtemel vaka sayılarının azlığına bağlı istatistiksel fark oluşturamamıştır.

PRAME çalışılan 82 hastamız için yapılan HSK analizinde, erkek cinsiyet, B semptomu olması, Beta2 mikroglobulin yüksekliği, 4 ve daha fazla lenf nodu tutulumu olması, mediastinal kitle olması ve ektranodal tutulumun olması halinde yaşam süresi daha kısa idi fakat fark istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi. Sedimentasyon her iki grupta eşit oranda saptandı. Hastanın 45 yaşının üstünde olması, ileri evrede olması, yüksek risk grubunda olması, IPS skorunun yüksek olması veya 4 ve üzerinde IPS skorunun olması, nüks olması ve relaps süresinin ≤ 12 aydan kısa olması durumlarında HSK, beklendiği üzere daha kısaydı ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. PRAME çalışılan 82 hasta için yapılan GSK analizinde ise kadın cinsiyet, B semptomu olmaması, normal Beta2 mikroglobulin, 4'ten az lenf nodu tutulumu olması, ektranodal tutulum olmaması, düşük risk grubunda ve nüks olmaması ve beklendiği gibi daha uzun idi ancak istatistiksel anlamlı bulunmadı. Diğer yandan 45 yaşın üstünde olmak, ileri

evre hastalık, IPS skorunun yüksek olması veya IPS'in ≥ 4 olması durumlarında GSK daha kısaydı ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Gerek HSK gerek GSK analizlerinde genel olarak bilinen kötü risk faktörü olan olguların daha kısa yaşam süresi olduğu ancak bunların tamamında istatistik farklılık saptanmaması olgu sayısının görece az olması ve/veya retrospektif analiz dezavantajı ile açıklanabilir

Toplam ve hastalıksız sağkalımı etkileyen bağımsız faktörlerin saptanmasında kullanılan çoklu regresyon analizine göre, sadece ileri yaş ve yüksek risk grubunun sağkalımı etkileyen bağımsız faktörler olduğu görülürken PRAME pozitifliğinin ölüm riskini arttırdığı (IHK için OR: 1,63 %95 GA:0,31-8,61 RT-PCR PRAME için 3,68 KAT) fakat anlamlı bir faktör olmadığı izlenmektedir. PRAME IHK ile GSK etkileyen bağımsız faktörlerden olan yüksek risk grubunda ölüm riski 5 kat, RT-PCR ile 5 kat artmıştı. HSK'yı etkileyen bağımsız faktör olarak yüksek risk grubu ölüm riskini IHK olarak 6,5, RT-PCR olarak 3,6 kat arttırmıştı. Ayrıca risk grubu içinde evre, sedimantasyon, B semptomu veya mediastinal kitle gibi değişkenler kullanılarak yapıldığı için sadece risk grubu değişkeni ile bunu çalışmak anlamlıydı. Elde edilen sonuçlar daha büyük veri tabanında çalışılmasının faydalı olduğunu göstermektedir.

Yapılan çalışmaların kısıtlılığı nedeniyle HL dışındaki tümörlerde PRAME ekspresyonlarının prognostik önemini gözden geçirmek, daha yararlı bir yorum yapabilmek için, yararlı olacaktır.

Nöroblastomada PRAME ekspresyonu sık olmaktadır ve ileri evre hastaların neredeyse tamamında PRAME ekspresyonu saptanmıştır ve PRAME ekspresyonuyla ileri tümör evresi ve ileri yaş arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. RT-PCR ile PRAME ekspresyonu saptanan bu çalışma prognozu belirlemede PRAME'in önemli olduğunu göstermiştir. Bu verilerle PRAME, nöroblastomada immunoterapi için ilgi çekici bir hedef gibi görülmektedir.³⁶²

Neumann ve ark. primer RCC dokusu ve RCC hücre dizinlerinde değişken sıklıkta RAGE-1, PRAME ve gp75 ekspresyonu bulmuşlardır. RCC hücre dizinlerinde yüksek düzeyde PRAME (10/14) eksprese edildiği bulunmuş ve diğer antijenlerle kıyaslamada en yüksek eksprese olan antijen olarak saptanmış (RAGE-1 (7/14) ve gp (4/14)) olup bu veri RCC hastalarından bir alt grubun immunoterapi için uygun bir hedef olduğu ve RAGE-1, gp75 ve/veya PRAME antijenlerine karşı RCC olgularının immunoterapiden fayda görebileceğini telkin etmektedir.³²⁴ Partheen ve ark. evre 3

seröz over adenokarsinomlarında PRAME ‘in kötü prognostik faktör olarak kullanılabileceğini göstermiştir.³⁶³ Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde kanser gelişim aşamalarında PRAME ekspresyonunun önemli olduğu saptanmıştır.³⁶⁴ Baş-boyun skuamöz hücreli karsinomlarının primer lezyonlarında ve bunların metastazlarında değişken oranda tümör spesifik genlerinin eksprese edildiği bulunmuş ve metastatik lenf nodlarında tamamında PRAME ekspresyonu saptanmıştır. İlginç bir bulgu olarak da primer lezyonlarda, iki veya daha yüksek oranda gen ekspresyonuyla, sigara alışkanlığı ve ileri evre tümörlerle PRAME arasında anlamlı ilişki bulunmasıdır.³⁶⁵ Yüksek PRAME ekspresyonu melanom lezyonlarının evresi ile korele bulunmuştur.³²³ Bankovic ve Ark 30 Akciğer kanserli vakanın 22’sinde (% 73) PRAME ekspresyonu saptamış, adeno kanserlerde % 88, skuamöz kanserlerde % 66 oranında PRAME saptanmıştır. Bu olgularda grade, evre, lenf nodu invazyonu ile PRAME ekspresyonu arasında ilişki bulunmamıştır. PRAME saptanmayan olgularda GSK daha kısa saptanmıştır.³⁶⁴

Diğer ilginç bir bulgu da meme kanserinde saptanmış, PRAME mRNA’sının meme kanserli dokuda % 27 ile % 53 arasında saptanırken normal meme dokusunda ise üçte bir bulunduğu bildirilmiştir.^{308,328} 295 meme kanserli hasta içeren geniş seride ise meme kanserli dokuların üçte birinde yüksek düzeyde, üçte ikisinde ise düşük düzeyde PRAME ekspresyonu saptanmıştır.³⁶⁷ PRAME ekspresyonunun HSK ve TSK için kötü prognostik faktör olduğu gösterilmiş, çok değişkenli analizde de PRAME mRNA ekspresyonunun kısalmış bu faktörler için bağımsız bir prognostik faktör olduğu gösterilmiştir. Ayrıca PRAME ekspresyonunun kısa nüks süresi ile korele olduğu saptanmış ve meme kanserinde PRAME’in ekspresyonunun prognostik ve prediktif bir belirleyici olduğu kanısına varılmıştır.³²⁸ Epping’in çalışmasında PRAME ekspresyonuyla, histolojik grade ve ER durumu arasında ilişki saptanmış, yüksek PRAME ekspresyonu ile kötü differansiye tümör arasında ilişki bulunmuştur. Ek olarak PRAME ekspresyonunun KT’ye cevabı değerlendirmede faydalı olabileceği belirtilmiş ve meme kanserli hastalarda, yüksek PRAME ekspresyonuyla artmış oranda uzak metastaz ve kısa süreli sağ kalım arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur.³⁶⁷ En fazla hasta çalışılan ve bizim de tez konumuza giren PRAME’in klinik özellikler ve prognostik parametrelerle ilişkisi bütün çalışmalarda benzer bulunmamıştır. Ayrıca normal meme dokusunda da olguların üçte birinde PRAME saptanması da bugüne kadar

anlamalı bir açıklama yapılamayan bulgulardan biridir. Bu da PRAME'in bilmediğimiz özelliklerinin bildiklerimizden daha fazla olduğunu telkin etmektedir. Van't Veer ve ark. meme kanserli hastalarda, meme kanserinin seyriyle ilgili 231 gen araştırılmış PRAME geninin de olduğu saptanmış olmasına karşın prognoz sınıflayıcısı olan 70 gen arasında PRAME gösterilememiştir. Meme kanserinde yüksek PRAME ekspresyonu metastaz gelişim olasılığının artışı ve kısa HSK ve GSK ile ilişkili bulunmuştur.³⁶⁶

Pingxian ve Ark 5 Osteosarkom hücre dizisinde ve hasta örneklerinde PRAME ekspresyonunu araştırdıkları çalışmalarında Osteosarkomlu hasta örneklerindelerinin % 70'den fazlasında PRAME ekspresyonu bulmuşlardır (69 hastada % 72,6, 32 hasta % 33,7'de % 50'nin üstünde boyanma vardı). Çalışmamızda olduğu gibi, bu çalışmada da immunhistokimyasal yöntemle de çalışılmış ve yüksek PRAME ekspresyonunu ve yüksek PRAME ekspresyonu ile kötü prognoz ve akciğer metastazı arasında ilişki saptamışlardır. Bu çalışmada diğer prognostik parametrelerden yaş, cinsiyet, lokalizasyon, histopatolojik özelliklerle ilişki saptanmamıştır. Yine bu çalışmada PRAME, siRNA ile susturulduğunda proliferasyon ve koloni oluşumu suprese olmuş, p27 protein ekspresyonunda artma olmuş ve G1'de hücre siklus arresti gösterilmiştir. Bu sonuçlar PRAME'in osteosarkomda hastalık progresyonu ve hücre proliferasyonunda önemli rol oynadığını göstermektedir. Bu çalışmada da, çalışmamızda olduğu gibi, Immunhistokimyasal olarak 2 bağımsız gözlemci PRAME ekspresyonunu değerlendirmiş, boyanma yaygınlığı tümör hücrelerinin <% 10 ise (+), % 10-50 ise (++), >% 50 ise (+++) kabul edilmiş. PRAME boyanma tümör hücrelerinin hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde gözlenmiştir. Tümör dokusunun yanı sıra yandaki cerrahi sınırdan RT-PCR ile PRAME çalışılmış osteosarkom dokusunda belirgin yüksek PRAME saptanmıştır.³⁷⁹ Bu çalışmada da IHK'nın da kullanılmış olması nedeniyle karşılaştırılabilirliği mümkün kılmakta ve bizim çalışmamıza paralel olarak PRAME için belirsizlikleri göstermektedir. Zaten bir prognostik parametrenin tüm prognostik faktörler için geçerli olmadığı gerçeği yaklaşık her tümör ve prognostik parametre için geçerlidir. Noroblastomada³⁶² ve Seröz Over Karsinomlarında³⁶³ PRAME ekspresyonu kısa GSK ile ilişkili bulunmuştur.

Hemopetik neoplazilerin arasında en yüksek PRAME ekspresyonu akut lösemilerde saptanmıştır AML'li değişik sayıda örneğin incelendiği çalışmalarda semikantitatif RT-PCR ile PRAME oranı % 35 ile % 47 arasında saptanmıştır.³¹⁵⁻³¹⁷ Yetişkin

ve çocuklarda görülen ALL olgularında PRAME gen ekspresyonu farklı oranlarda bulunmuştur. Çocukluk çağı ALL'lerde % 20 ile % 42'sinde PRAME ekspresyonu saptanırken,^{315,346} yetişkin ALL olgularında % 64 PRAME ekspresyonu saptanmıştır.³¹⁷ Paydaş ve ark. AML'de PRAME ekspresyonu ile bazı olumlu prognostik parametreler arasında ilişki gösterilmişse de bütün olumlu parametrelerle ilişki saptanmamıştır.³²⁰ Spanaki ve ark. çalışmasında çocukluk çağı 17 Akut Lösemi vakasında PRAME ekspresyonu % 52,9 oranında saptanmış, kontrol gruplarında PRAME ya saptanmamış yada çok düşük saptanmıştır.³⁷⁴ Grenier ve ark. 116 AML olgusunda PRAME'in de dahil olduğu bazı antijenlerle uzamış GSK arasında korelasyon saptamalarına karşın istatistiksel farklılık saptanmamıştır.³⁵⁷ Guinn ve arkadaşları AML'li hastalarda microarray analizi ile 82 tümör antijeni tespit etmişler ve bu antijenlerin 9'nun KTA olmak üzere 11'i tümör ilişkili antijen olarak tanımlanmış ve bunlardan birinin de PRAME olduğu, ancak bu antijenler ile TSK arasında ilişki saptanmamıştır. RT-PCR ile AML'de PRAME ekspresyonu olguların % 54'ünde saptanmış ve normal kontrollerden ≥ 1 log daha fazla PRAME saptanmış ve yüksek ekspresyon seviyeleri ile yaşam süresi arasında bir ilişki bulunmamıştır.^{358,373} Mc Elwaine ve ark. PRAME'i geçici myeloproliferatif sendrom ile Down Sendromlularda Progresif Akut Megakaryoblastik Lösemiler arasındaki ayırmada,³⁵⁴ Radich ve ark. ise KML'nin blastik ve kronik fazının ayırımında kullanılabileceği ve artmış PRAME ekspresyonunun artmış mortalite ile ilişkisi olduğu saptanmıştır.³⁴⁸ PRAME, APL2de bağımsız bir prognostik faktör ve uzamış GSK ile ilişkili bulunmuştur. İlginç olarak monozomi 7 ve 7 kromozom uzun kol delesyonu olan kötü prognozlu karyotiplerde bile uzamış GSK ilişkisi saptanmıştır.³⁷⁶ Diğer bir çalışmada ise AML'de tanıda düşük PRAME ekspresyonu KT indüsyonuna refrakter hastalıkla ilişkili bulunmuş, daha kısa relapsız yaşam ve kötü GSK ile ilişkilendirilmiştir.³⁷⁷ Özetle akut lösemilerde de PRAME ekspresyonu ile klinik ve laboratuvar bulguları arasındaki ilişkiler net değildir. Ancak bazı çalışmalarda PRAME ekspresyonu olan AML'li çocuklarda, olmayanlara göre gerek HSK gerekse TSK daha uzun bulunmuş, tanı anındaki beyaz küre sayısı ile PRAME negatif korelasyon göstermiş, PRAME pozitif lösemili olgular KT'den sonra daha düşük relaps göstermiş, t(8:21) ve t(15:17) gibi iyi sitogenetik göstergeler saptanan olgularda PRAME yüksek saptanmış olup iyi prognoz belirleyicileri ile PRAME arasında

gösterilmiş olmasına karşın bütün çalışmalarda prognostik öneminin gösterilememiş olması lösemiler için de belirsizliğin göstergesidir.^{315,317,319,346}

Kronik lenfoproliferatif hastalıklarda, PRAME ekspresyonu ile klinik ve laboratuvar bulguları arasında korelasyon saptanmamıştır. Ancak PRAME, agresif seyirli lenfoproliferatif hastalıklarda daha fazla saptanmıştır.³¹⁸ Multipl myeloma olgularında da agresif seyir ile PRAME paralelliği saptanmıştır.³⁴⁹ KML progresyonu sırasında PRAME ekspresyonunun arttığı unutulmamalıdır.³¹⁷ Paydaş ve ark. 88 kronik Lösemili hasta, 42 kontrol hastasında RT-PCR ile PRAME çalışmasında toplam 29 (%33) hastada PRAME ekspresyonu saptamış, kontrollerle kıyaslandığında hastalarda yüksek ekspresyon saptanmıştır. Fakat bu çalışmada da PRAME ekspresyonu ile klinik parametreler ve tedaviye cevap açısından fark gözlenmemiştir. Ayrıca PRAME izlem esnasında 8 KML vakasında monitorize edilmiş ve PRAME ekspresyonu progresyonda artmış, kronik fazda azalmıştır.³⁰⁹

HL'da PRAME çalışmaları kısıtlıdır. Van Baren karışık hemopoetik neoplazileri içeren çalışmasında 7 olgu HL idi ve sadece birinde pozitiflik saptanmıştır. Martin S. Staege ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada PRAME ekspresyonu, yalnızca rezistan HL'lı olgulara ait hücre serilerinde gösterilmiştir.^{304,316} Klaus Willenbrock ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HL'lı hastalara ait örnekler, anaplastik büyük hücre lenfoma ve B hücreli NHL'larla karşılaştırıldığında PRAME ekspresyonunun HL'da çok yüksek bulunmuştur.³¹⁷ Chambost ve ark. Reed Stenberg Hücrelerinde PRAME ile aynı aileden olan bir KTA olan MAGE-A4 gen ekspresyonunu incelemiş, RT-PCR ile 18 HL vakasının 5'inde (% 28) MAGE-A4 ekspresyonu saptanmış olup bu beş olgunun 4'ünün NS tip 1'inin MS alt tipte olduğu saptanmıştır. Bizim serimizde de IHK ile PRAME saptanan 15 olgunun 9'u NS tipte, RT-PCR ile PRAME saptanan 8 olgunun 4'ü NS HL alt tipine sahipti. MAGE-A4 tanıyan monoklonal antikor ile yapılan bir çalışmada 53 HL olgusunun 11'inde (% 21) ekspresyon saptanmıştır. İlginç olarak güçlü ekspresyon özellikle RS hücrelerinde saptanmış, ortamdaki diğer hücrelerde ekspresyon saptanmamıştır. Bizim de IHK incelememizde RS hücrelerinde ekspresyon gösterilmesi bu hücrelerin immunoterapi KTA ile yapılan immunoterapi için iyi bir hedef olabileceğini telkin edebilir.³⁷⁵

HL'da kemorezistans en önemli sorunlardan biri olup bununla ilgili belirteçleri tanımlamak temel önemdedir. Bu bağlamda Staege ve ark. KT'ye rezistans ve duyarlı

HL hastalarında farklı gen ekspresyonlarının profilini araştırmışlar ve rezistan olgularda IL13RA1, IL5RA gibi sitokin resptörler, CD40, CD80 gibi antijen sunan hücreler üzerinde eksprese olan belirteçlerle birlikte PRAME de artmış olarak bulunmuştur. Bu veriler bizim çalışmamızda saptanan bazı kötü prognostik parametrelerle PRAME ilişkisi ile uyum göstermektedir. Rezistan HL'da gerçekten yüksek oranda eksprese olduğu daha geniş serilerde de saptanır ise bu genler, gelecekteki terapatik yaklaşımlar için potansiyel hedef olabilir.³⁴² Nitekim yüksek PRAME ekspresyonu DBBHL'da ve HL'da KT'ye artmış rezistans ile ilgili bulunmuştur.³⁷⁸ Kawano ve ark. antrasiklinli tedaviye refrakter hastalar ile duyarlı hastalar arasında gen ekspresyon paternini incelediklerinde 9 genin ekspresyonunun refrakter grupta arttığını bulmuşlardır. Bu genlerden en fazla artanın PRAME olduğu saptanmıştır (kontrolden 4 kat fazla). Antrasklin ile tedavi edilen diffüz büyük B hücreli lenfomada PRAME çalışılmış, risk grupları farklı bulunmazken PRAME gen ekspresyonu olan ve olmayan hastalarda HSK incelendiğinde PRAME pozitif hastaların HSK daha kısa bulunmuştur. Hastalık seyri sırasında progresyon saptanan olguların % 50'sinde PRAME pozitif iken tam yanıt veren hastaların % 18'inde PRAME saptanmıştır. Sonuç olarak Antrasiklinli tedaviye dirençli hasta grubunda PRAME geninin belirgin arttığı ve PRAME ekspresyonu olan hastaların daha kısa HSK'a sahip olduğu bulunmuştur.³⁷⁸

PRAME ile HL klinik özellikleri arasında bir bağlantı olup olmadığını saptamaya yönelik çalışmamızda, RT-PCR ile PRAME pozitifliği IPS 4 ve üstünde olan grupta daha fazla saptanmıştır. IPS'in HL prognozu göstermede etkisi düşünüldüğünde ve birçok faktör ile ilişkili olması nedeniyle bu bulgunun önemli olduğu aşıkardır. PRAME çalışılan hasta grubumuzun da 45 yaş üstü, ileri evre, yüksek risk grubu, artmış IPS, tedavi sonrası nüks olması kısa relaps süresinin HSK kısalttığı, 45 yaş üstü, ileri evre, artmış IPS'in ise GSK'ı kısalttığı saptanmıştır. PRAME çalışılan grubun HL grubu ile aynı kohort olduğu düşünüldüğünde, HL ile ilgili, literatürde kötü prognostik verilere benzer şekilde kötü prognostik özelliklerde beklendiği gibi daha kısa HSK ve GSK saptandı. PRAME bağımsız bir prognostik faktör olmasa da ölüm riskini arttırması da HL'da PRAME'in olumsuz klinik veriler ile ilişkisini gözler önüne sermektedir. RT-PCR ile saptanan PRAME pozitifliği ile 4 ve üzerinde IPS skoru olan hastalarda PRAME anlamlı şekilde daha fazla saptanmıştır, PRAME (-) olgularda TSK ve HSK daha uzun bulundu ve aradaki fark önemli idi. İstatisitksel anlamlı olmasa da PRAME

saptanan hastalar daha ileri yaşıta idi. Diğer yandan yine istatistiksel anlamlı olmasa da ölüm riskinin 3,58 kat artmış bulunması RT-PCR ile saptanan PRAME'in daha önemli bir gösterge olduğunu telkin etmektedir. IHK ile PRAME saptanan olgularda gerek HSK gerekse TSK daha kısa idi, ancak fark istatistiksel anlamlı bulunmadı. Bu veriler PRAME ekspresyonunun HL'da kötü prognostik parametre olabileceğini işaret etmektedir.

Tümör antijenlerinin bugün için kullanım alanı rezidüel kanser hücrelerinin varlığını saptamak ya da tedavi için hedef olarak kullanılabilirlikleridir. Terapotik olarak daha etkili ve daha az toksik kanser tedavisi için yapılması gereken terapatik ajanların seçiciliğinin arttırılmasıdır. BCR-ABL ve Her2-neu'nun gibi çok başarılı hedefler ile PRAME'in ortak iki özelliği vardır. Birincisi çoğunlukla tümör hücrelerine kısıtlı yüksek PRAME ekspresyonu, ikincisi ekspresyonun onkojenik fenotipe katkıda bulunmasıdır. Kanserde PRAME'i hedef olarak kullanmak için iki strateji vardır. İlki intrinsik immunojenitesine rağmen tümör hücreleri tarafından üretilen immun supresif mekanizma ve faktörlerle immun cevabın azalmasına karşı, T hücreli immun cevabı arttırmak için tasarlananlardır. Komplet remisyonda AML hastalarında PRAME için spesifik T hücre cevabı saptanmışken, refrakter AML'de saptanmaması bunu destekleyici niteliktedir. Yani bu T hücre cevabının tümör eradikasyonuna katkıda bulunacağını söyler. Kliniğimizde daha önce yapılan akut lösemi çalışmasında en yüksek PRAME ekspresyonu gösteren olguda allogeneik nakil sonrasında PRAME 0 olarak saptanmış olup bu olgu 9 yılı aşkın süredir tam remisyonda olarak yaşamaktadır. İkincisi ise aşılama fakat KTA'lerinin tümör heterojenitesi bu antijenlere yönelmiş aşılamanın etkinliğine engel olabilir. Bunun için örnek ilk kez AML hastalarında PRAME hedefleyen otolog dendritik hücrelerin kullanıldığı çalışmadır. PRAME intrinsik enzimatik aktivitesi gösterilemediğinden küçük moleküllü ilaçlar tarafından hedef olarak kullanılamaz.³³¹

Hücre membranı ve sitoplazmasında bulunan PRAME, sitotoksik T-lenfositleri tarafından tanınan immunojenik bir antijen olmasından ötürü bazı malign tümörde immunoterapi amaçlı kullanılabileceğini telkin eden bulgular vardır. PRAME ilişkili immun yapılanma ve immunoterapinin mekanizması önümüzdeki yıllarda çok daha fazla anlaşılacak ve klinikte yerini bulacaktır.

Mevcut bilgiler ışığında hematolojik neoplazilerde ve solid tümörlerde PRAME ekspresyonu olduğunu anlamaktayız. Çalışmamızda RT-PCR ile % 9,8, İHK ile % 18,3 pozitiflik özellikle literatürdeki çalışmaların çoğunluğunu oluşturan RT-PCR için daha düşük görünmekte fakat İHK ile kıyaslayacağımız veri ise yoktur. Bu farklı oranlar PRAME ekspresyon tespiti için yapılan farklı yöntemler ve kullanılan farklı doku örneklerine bağlanabilir. Bundan önceki çalışmaların çok büyük kısmının taze dokular ile yapılması ve özellikle RT-PCR için daha uygun olması, bizim çalışmamızdaki gibi parafinli dokuda yapılmış çalışma dizaynlarında dezavantaja neden olur. Ayrıca PRAME'in kısa sürede çoklu gen duplikasyonları ile evrim aşamasında olduğu görülmekte ve en az 22 PRAME benzeri gen ve 10 pseudogen insan genomunda tespit edilmiştir. Bu hızlı evrim, çoğalma ve immunitede tutulmuş gen kümelerinin adaptif seçimleri ile tutarlı görünmektedir.³⁸¹ İHK yöntemle ve RT-PCR ile saptanan PRAME sonuçları ile istatistiksel anlamlı paralelik göstermediler. Bu bulgu PRAME ekspresyonunun saptanmasında parafinli dokularda İHK yöntemle çalışılarak takibi uzun süre yapılmış olgularda geriye dönük PRAME ekspresyonunun prognostik ve varsa prediktif değerini belirlemek için daha yüksek sayılı çalışmalara ihtiyacı gösterir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1- Bu çalışmada 82 HL olgusunda IHK ve RT-PCR yöntemleri ile PRAME araştırıldı. IHK ile toplam 15 hastada ekspresyon saptanırken RT-PCR ile 8 olguda PRAME saptandı.

2- Daha hassas bir yöntem olması nedeniyle RT-PCR ile daha fazla olguda ekspresyon saptanması beklenirken daha az sayıda olguda saptanması doku fiksasyonu ve parafinleme işlemleri sırasında RNA kaybı nedeniyle olabilir.

3- Bu çalışmada IHK kullanılarak da PRAME saptanabildiği gösterildi. Özellikle histiyositler ve RS hücrelerinde PRAME ekspresyonunun saptanması taze doku örneklerinde PRAME çalışmaları sırasında özellikle bu 2 hücre grubunda PRAME çalışılmasının yararlı olabileceğini telkin etmektedir. RT-PCR çalışmalarında da bu hücrelerde diğer hücrelerle kıyaslamada daha yüksek oranda ya da miktarda PRAME saptanması halinde bu veri özellikle son yıllarda HL'da mikroçevre biyolojisine katkıda bulunabilir. Literatürde kısıtlı veri daha çok hücre dizilerine aittir ve klinik örneklerle yapılmış yeterli çalışma yoktur. Hücre dizilerinde yapılan çalışmalar ise PRAME ekspresyonunun rezistan olgularda saptandığını göstermektedir. Bu veri klinik örneklerde de kanıtlanır ise rezistan olgular için PRAME bir hedef olabilir. Pek çok neoplazide olduğu gibi primer tümör hücrelerinin yanı sıra mikroçevrenin de hedeflenmesi stratejisini mantıklı kılabilir.

4- PRAME çalışılan hasta grubunda 45 yaş üstü, ileri evre, yüksek risk grubu, yüksek IPS, tedavi sonrası nüks olması, kısa relaps süresinin HSK'ı kısalttığı, 45 yaş üstü, ileri evre, yüksek IPS'in ise GSK'ı kısalttığı saptandı ve bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıydı.

5- Toplam ve hastalıksız sağkalımı etkileyen bağımsız faktörler olarak, sadece yaş ve risk grubunun sağkalımı etkileyen bağımsız faktörler olduğu görülürken PRAME pozitifliğinin anlamlı bir faktör olmadığı fakat ölüm riskini arttırdığı saptandı.

6- PRAME ekspresyonu ile klinik prognostik faktörler kıyaslandığında RT-PCR ile saptanan PRAME pozitifliği ile 4 ve üzerinde IPS skoru olan hastalarda PRAME anlamlı şekilde daha fazla saptandı. PRAME (-) olgularda TSK ve HSK daha uzun bulundu ve aradaki fark önemli idi. İstatistiksel anlamlı olmasa da PRAME saptanan hastalar daha ileri yaşta idi. Diğer yandan yine istatistiksel anlamlı olmasa da ölüm

riskinin 3.58 kat artmış bulunması RT-PCR ile saptanan PRAME'in daha önemli bir gösterge olduğunu telkin etmektedir. IHK ile PRAME saptanan olgularda gerek HSK gerekse TSK daha kısa idi, ancak fark istatistiksel anlamlı bulunmadı. Bu veriler PRAME ekspresyonunun HL'da kötü prognostik parametre olabileceğini işaret etmektedir. Bu verilerin daha geniş hasta gruplarında ve tercihen prospektif hasta serilerinde kanıtlanması halinde immunoterapi için PRAME çekici ve iyi bir hedef gibi görünmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Staeger MS, Banning-Eichenseer U, Weissflog G, Volkmer I, Burdach S, Richter G, Mauz-Körholz C, Föll J, Körholz D.** Gene expression profiles of Hodgkin's lymphoma cell lines with different sensitivity to cytotoxic drugs. *Exp Hematol.* **2008** Jul;36(7):886-96. Epub 2008 Apr 8.
2. **Schenk T, Stengel S, Goellner S, Steinbach D, Saluz HP.** Hypomethylation of PRAME Is Responsible for Its Aberrant Overexpression in Human Malignancies Genes Chromosomes Cancer. **2007** Sep;46(9):796-804.
3. **Ikeda H, Lethe B, Lehmann F.** Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* **1997**;6:199-208.
4. **Bustin SA.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **2000**;25:169–93.
5. **Paydaş S, Tanrıverdi K, Yavuz S, Seydaoğlu G.** PRAME mRNA levels in cases with chronic leukemia: clinical importance and review of the literature. *Leuk Res*, **2007**;31:365-9.
6. **Yin B.** PRAME: From diagnostic marker and tumor antigen to promising target of RNAi therapy in leukemic cells. *Leuk Res.* **2011 Sep**;35(9):1159-60. Epub **2011** May 17.
7. **Prabhala RH, Munshi NC.** Immune Therapies. *Hematol Oncol Clin North Am.* **2007** Dec;21(6):1217-30.
8. **Epping MT, Wang L, Edel MJ, Carlee L, Hernandez M, Bernards R.** The human tumour antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell*, **2005**;122:835-847
9. **Epping MT, Bernards R.** A causal role for the human tumour antigen preferentially expressed antigen of melanoma in cancer. *Cancer Res*, **2006**;66:10639-10642
10. **Tanaka N, Wang YH, Shiseki M, Takanashi M, Motoji T.** Inhibition of PRAME expression causes cell cycle arrest and apoptosis in leukemic cells. *Leuk Res.* **2011 Sep**;35(9):1219-25. Epub **2011** May 7.
11. **Paydaş S.** Is everything known in all faces of iceberg in PRAME? *Leuk Res.* **2008 Sep**;32(9):1356-7. Epub **2008 Apr 9**.
12. **Tajeddine N, Gala JL, Louis M, SchoorMV, Tombal B, Gailly P.** Tumor-associated antigen preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) induces caspase-independent cell death in vitro and reduces tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* **2005**;65:7348–55.
13. **Costessi A, Mahroun N, Tijchon E, Stunnenberg R, Stoel MA, Jansen PW, Sela D, Martin-Brown S, Washburn MP, Florens L, Conaway JW, Conaway RC, Stunnenberg HG** The tumour antigen PRAME is a subunit of a Cul2 ubiquitin ligase and associates with active NFY promoters. *EMBO J.* **2011 Aug 5**;30(18):3786-98.
14. **Willenbrock K, Kuipers R, Renne C, et al.** Common features and differences in the transcriptome of large cell anaplastic lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica.* **2006**;91:596–604.
15. **Lanzkowsky P.** *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*, 4 th ed. **2005** (453-490).

16. **Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds).** World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC Press, Lyon **2001**.
17. **Jemal A, Siegel R, Ward E, et al.** Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, **2009**; 59:225.
18. **Siegel R, Naishadham D, Jemal A.** Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, **2012**; 62:10.
19. **Sant M, Allemani C, Tereanu C, et al.** Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* **2010**; 116:3724.
20. **Morton LM, Wang SS, Devesa SS, et al.** Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*, **2006**; 107:265.
21. **Sant M, Allemani C, Tereanu C, et al.** Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*, **2010**; 116:3724.
22. **Stiller CA.** What causes Hodgkin disease in children? Review. *Eur J Cancer*, **1998**; 34 :523-8.
23. **Ries LA, Kosary CL, Hankey BF, et al. (Eds).** SEER cancer statistics review: 1973-1994, NIH publ no. 97-2789, National Cancer Institute, *Bethesda* **1997**.
24. **Correa P, O'Connor GT.** Epidemiologic patterns of Hodgkin's disease. *Int J Cancer*, **1971**; 8:192.
25. **Diehl V, Sextro M, Franklin J, et al.** Clinical presentation, course, and prognostic factors in lymphocyte-predominant Hodgkin's disease and lymphocyte-rich classical Hodgkin's disease: report from the European Task Force on Lymphoma Project on Lymphocyte-Predominant Hodgkin's Disease. *J Clin Oncol*, **1999**; 1:776.
26. **Correa P, O'Connor GT.** Geographic pathology of lymphoreticular tumors: summary of survey from the geographic pathology committee of the international union against cancer. *J Natl Cancer Inst*, **1973**; 50:1609.
27. **Guttensohn N, Cole P.** Childhood social environment and Hodgkin's disease. *N Engl J Med*, **1981**; 304:135.
28. **Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (Eds).** *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, IARC Press, Lyon **2008**.
29. **Westergaard T, Melbye M, Pedersen JB, et al.** Birth order, sibship size and risk of Hodgkin's disease in children and young adults: a population-based study of 31 million person years. *Int J Cancer* **1997**; 72: 977-981
30. **Cozen W, Katz J, Mack TM.** *Risk patterns of Hodgkin's disease in Los Angeles vary by cell type.* *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **1992**; 1:261.
31. **Glaser SL.** Regional variation in Hodgkin's disease incidence by histologic subtype in the US. *Cancer*, **1987**; 60:2841.
32. **McNally RJ, Alston RD, Cairns DP, et al.** Geographical and ecological analyses of childhood acute leukaemias and lymphomas in north-west England. *Br J Haematol*, **2003**; 123:60.
33. **Hu E, Hufford S, Lukes R, et al.** Third-World Hodgkin's disease at Los Angeles County-University of Southern California Medical Center. *J Clin Oncol* **1988**; 6:1285.

34. **Jarrett RF, MacKenzie J.** Epstein-Barr virus and other candidate viruses in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Semin Hematol*, **1999**; 36:260.
35. **Flavell KJ, Biddulph JP, Powell JE, et al.** South Asian ethnicity and material deprivation increase the risk of Epstein-Barr virus infection in childhood Hodgkin's disease. *Br J Cancer*, **2001**; 85:350.
36. **Vianna NJ, Greenwald P, Brady J, et al.** Hodgkin's disease: cases with features of a community outbreak. *Ann Intern Med* **1972**; 77:169.
37. **Vianna NJ, Polan AK.** Epidemiologic evidence for transmission of Hodgkin's disease. *N Engl J Med*, **1973**; 289:499.
38. **Grufferman S, Cole P, Levitan TR.** Evidence against transmission of Hodgkin's disease in high schools. *N Engl J Med* **1979**; 300:1006.
39. **Chang ET, Zheng T, Weir EG, et al.** Childhood social environment and Hodgkin's lymphoma: new findings from a population based case control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2004**; 13 (8): 1361-1370
40. **Mueller N, Evans A, Harris NL, et al.** Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Altered antibody pattern before diagnosis. *N Engl J Med*, **1989**; 320:689.
41. **Lehtinen T, Lumio J, Dillner J, et al.** Increased risk of malignant lymphoma indicated by elevated Epstein-Barr virus antibodies--a prospective study. *Cancer Causes Control*, **1993**; 4:187.
42. **Alexander FE, Jarrett RF, Lawrence D, et al.** Risk factors for Hodgkin's disease by Epstein-Barr virus (EBV) status: prior infection by EBV and other agents. *Br J Cancer*, **2000**; 82:1117.
43. **Hjalgrim H, Askling J, Sørensen P, et al.** Risk of Hodgkin's disease and other cancers after infectious mononucleosis. *J Natl Cancer Inst*, **2000**; 92:1522.
44. **Armstrong AA, Shield L, Gallagher A, Jarrett RF.** Lack of involvement of known oncogenic DNA viruses in Epstein-Barr virus-negative Hodgkin's disease. *Br J Cancer*, **1998**; 77:1045.
45. **Jarrett RF.** Viruses and Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* **2002**; 13 (S1):23-29.
46. **Jarrett RF, Armstrong AA, Alexander E.** Epidemiology of EBV Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* **1996**; 7 (suppl): S5-S10.
47. **Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, Young LS.** Expression of Epstein Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkins disease. *Lancet*, **1991**; 337:320-322
48. **Andrliko JA, Aguilera NS, Nandedkar MA, Abbondanzo SL.** Childhood Hodgkin's disease in the United States: an analysis of histologic subtypes and association with Epstein Barr virus. *Mod Pathol*, **1997**; 10: 366-371.
49. **Enblad, G., Sandvej, K., Lennette, E., et al.** Lack of correlation between EBV serology and presence of EBV in the Hodgkin and Reed-Sternberg cells of patients with Hodgkin's disease. *Int J Cancer.* **1997**; 72: 394-7.
50. **Glaser, S.L., Lin, R.J., Stewart, S.L., et al.** Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer*, **1997**; 70: 375-82

51. **Goedert JJ, Coté TR, Virgo P, et al.** Spectrum of AIDS-associated malignant disorders. *Lancet* **1998**; 351:1833.
52. **Tinguely M, Vonlanthen R, Müller E, et al.** Hodgkin's disease-like lymphoproliferative disorders in patients with different underlying immunodeficiency states. *Mod Pathol*, **1998**; 11:307.
53. **Glaser SL, Clarke CA, Gulley ML, et al.** Population-based patterns of human immunodeficiency virus-related Hodgkin lymphoma in the Greater San Francisco Bay Area, 1988-1998. *Cancer* **2003**; 98:300.
54. **Garnier JL, Lebranchu Y, Dantal J, et al.** Hodgkin's disease after transplantation. *Transplantation*, **1996**; 61:71.
55. **Patel P, Hanson DL, Sullivan PS, et al.** Incidence of types of cancer among HIV-infected persons compared with the general population in the United States, 1992-2003. *Ann Intern Med*, **2008**; 148:728.
56. **Grulich AE, Li Y, McDonald A, et al.** Rates of non-AIDS-defining cancers in people with HIV infection before and after AIDS diagnosis. *AIDS*, **2002**; 16:1155.
57. **Dal Maso L, Franceschi S, Polesel J, et al.** Risk of cancer in persons with AIDS in Italy, 1985-1998. *Br J Cancer* **2003**; 89:94.
58. **Herida M, Mary-Krause M, Kaphan R, et al.** Incidence of non-AIDS-defining cancers before and during the highly active antiretroviral therapy era in a cohort of human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Oncol*, **2003**; 21:3447.
59. **Clifford GM, Polesel J, Rickenbach M, et al.** Cancer risk in the Swiss HIV Cohort Study: associations with immunodeficiency, smoking, and highly active antiretroviral therapy. *J Natl Cancer Inst*, **2005**; 97:425.
60. **Spina M, Berretta M, Tirelli U.** Hodgkin's disease in HIV. *Hematol Oncol Clin North Am*, **2003**; 17:843.
61. **Goedert J, J Coté, T.R, Virgo P, et al.** Spectrum of AIDS-associated malignant disorders. *Lancet*, **1998**; 351: 1833–9.
62. **Bellas C, Santón A, Manzanal, A, et al.** Pathological, immunological, and molecular features of Hodgkin's disease associated with HIV infection. Comparison with ordinary Hodgkin's disease. *Am J Surg Pathol*, **1996**; 20: 1520–4.
- 63- **Adami J, Gäbel H, Lindelöf B, et al.** Cancer risk following organ transplantation: a nationwide cohort study in Sweden. *Br J Cancer*, **2003**; 89: 1221-7
64. **Landgren O, Pfeiffer RM, Kristinsson SY, Björkholm M.** Survival patterns in patients with Hodgkin's lymphoma with a pre-existing hospital discharge diagnosis of autoimmune disease. *J Clin Oncol*, **2010**; 28:5081.
65. **Landgren O, Engels EA, Pfeiffer RM, et al.** Autoimmunity and susceptibility to Hodgkin lymphoma: a population-based case-control study in Scandinavia. *J Natl Cancer Inst* **2006**; 98:1321.
66. **Ekström, K., Hjalgrim, H., Brandt, L., et al.** Risk of malignant lymphomas in patients with rheumatoid arthritis and in their first-degree relatives. *Arthritis Rheum*, **2003**;48: 963-70

67. Vineis P, Crosignani P, Viganò C, et al. Lymphomas and multiple sclerosis in a multicenter case-control study. *Epidemiology*; **2001 Jan**;12(1):134-5.
68. Vineis P, Crosignani P, Sacerdote C, et al. Hematopoietic cancer and medical history: a multicentre case control study. *J Epidemiol Community Health*, **2000**; 9:59-64
69. Landgren O, Björkholm M, Montgomery S. M, et al. Personal and family history of autoimmune diabetes mellitus and susceptibility to young-adult-onset Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*, **2006**; 118: 449-52
70. Goldin LR, Pfeiffer RM, Gridley G, et al. Familial aggregation of Hodgkin lymphoma and related tumors. *Cancer*, **2004**; 100:1902.
71. Goldin LR, Björkholm M, Kristinsson SY, et al. Highly increased familial risks for specific lymphoma subtypes. *Br J Haematol*, **2009**; 146:91.
72. Hjalgrim H, Rasmussen S, Rostgaard K, et al. Familial clustering of Hodgkin lymphoma and multiple sclerosis. *J Natl Cancer Inst*, **2004**; 96:780.
73. Grufferman S, Cole P, Smith PG, Lukes RJ. Hodgkin's disease in siblings. *N Engl J Med*, **1977**; 296:248.
74. Mack TM, Cozen W, Shibata DK, et al. Concordance for Hodgkin's disease in identical twins suggesting genetic susceptibility to the young-adult form of the disease. *N Engl J Med*, **1995**; 332:413.
75. Oza AM, Tonks S, Lim J, et al. A clinical and epidemiological study of human leukocyte antigen-DPB alleles in Hodgkin's disease. *Cancer Res*, **1994**; 54:5101.
76. Harty LC, Lin AY, Goldstein AM, et al. HLA-DR, HLA-DQ, and TAP genes in familial Hodgkin disease. *Blood*, **2002**; 99:690.
77. Kamper PM, Kjeldsen E, Clausen N, et al. Epstein-Barr virus-associated familial Hodgkin lymphoma: paediatric onset in three of five siblings. *Br J Haematol*, **2005**; 129:615.
78. Diepstra A, Niens M, Vellenga E, et al. Association with HLA class I in Epstein-Barr-virus-positive and with HLA class III in Epstein-Barr-virus-negative Hodgkin's lymphoma. *Lancet*, **2005**; 365:2216.
79. Huang X, Kushekhar K, Nolte I, et al. Multiple HLA class I and II associations in classical Hodgkin lymphoma and EBV status defined subgroups. *Blood*, **2011**; 118:5211.
80. Cozen W, Li D, Best T, et al. A genome-wide meta-analysis of nodular sclerosing Hodgkin lymphoma identifies risk loci at 6p21.32. *Blood*, **2012**; 119:469.
81. Huang X, Kushekhar K, Nolte I, et al. HLA Associations in Classical Hodgkin Lymphoma: EBV Status Matters. *PLoS One*, **2012**; 7:e39986.
82. Freedman L.S, Barchana M, Al-Kayed S, et al. A comparison of population-based cancer incidence rates in Israel and Jordan. *Eur J Cancer*, **2003**; 12: 359-65.
83. Goldin L.R, McMaster M.L, Ter-Minassian M, et al. A genome screen of families at high risk for Hodgkin lymphoma: evidence for a susceptibility gene on chromosomes 4. *J Med Genet*, **2005**; 42: 595-601.

84. **Grufferman S, Davis MK, Ambinder RF, et al.** A protective effect of breast-feeding on risk of Hodgkin's disease in children. *Paediatr Perinat Epidemiol*, **1998**; 12:13.
85. **Davis MK, Savitz DA, Graubard BI.** Infant feeding and childhood cancer. *Lancet*, **1988**; 2:365.
86. **Chang ET, Zheng T, Weir EG, et al.** Aspirin and the risk of Hodgkin's lymphoma in a population-based case-control study. *J Natl Cancer Inst*, **2004**; 96:305.
87. **Nieters A, Rohrmann S, Becker N, et al.** Smoking and lymphoma risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol*, **2008**; 167:1081.
88. **Castillo JJ, Dalia S, Shum H.** Meta-analysis of the association between cigarette smoking and incidence of Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol*, **2011**; 29:3900.
89. **Mueller N.E, Grufferman S.** Hodgkin's disease. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr (eds). *Cancer epidemiology and prevention*, 2nd ed. New York: Oxford University Press, **1996**; 893-919.
90. **Grufferman S, Delzell E.** Epidemiology of Hodgkin's disease. *Epidemiol Rev*, **1984**; 6: 76-106.
91. **Liaw, K.L., Adami, J., Gridley, et al.** Risk of Hodgkin's disease subsequent to tonsillectomy: a population-based cohort study in Sweden. *Int J Cancer*, **1997**;72: 711-3.
92. **Wolk A, Gridley G, Svensson M, et al.** A prospective study of obesity and cancer risk (Sweden). *Cancer Causes Control*, **2001**; 12: 13-2.
93. **Philip A Pizzo, David G.** Poplock Principles and Practice of Pediatric Oncology. Third Edition Lippincott Raven p.1997 523-543
94. **Brauninger A, Schmitz R, Bechtel D, et al.** Mini review: molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*. **2005**;118 (8): 1853-1861.
95. **Re D, Kuppers R, Diehl V.** Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. **2005**; 23 (26): 6379-6386.
96. **Lukes R, Butler J, Hicks E.** Natural history of Hodgkin's disease as related to its pathological picture. *Cancer*, **1966**; 19:317.
97. **Lukes RJ, Butler JJ.** The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. *Cancer Res* **1966**; 26:1063.
98. **Strickler JG, Michie SA, Warnke RA, Dorfman RF.** The "syncytial variant" of nodular sclerosing Hodgkin's disease. *Am J Surg Pathol*, **1986**; 10:470.
99. **Sextro M, Diehl V, Franklin J, et al.** Lymphocyte predominant Hodgkin's disease--a workshop report. European Task Force on Lymphoma. *Ann Oncol*, **1996**; 7 Suppl 4:61.
100. **Ashton-Key M, Thorpe PA, Allen JP, Isaacson PG.** Follicular Hodgkin's disease. *Am J Surg Pathol*, **1995**; 19:1294.
101. **Neiman RS, Rosen PJ, Lukes RJ.** Lymphocyte-depletion Hodgkin's disease. A clinicopathological entity. *N Engl J Med*, **1973**; 288:751.

102. **Leoncini L, Del Vecchio MT, Kraft R, et al.** Hodgkin's disease and CD30-positive anaplastic large cell lymphomas--a continuous spectrum of malignant disorders. A quantitative morphometric and immunohistologic study. *Am J Pathol*, **1990**; 137:1047.
103. **Stein H, Herbst H, Anagnostopoulos I, et al.** The nature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells, their association with EBV, and their relationship to anaplastic large-cell lymphoma. *Ann Oncol* **1991**; 2 Suppl 2:33.
104. **Braeuninger A, Küppers R, Strickler JG, et al.** Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1997**; 94:9337.
105. **Marafioti T, Hummel M, Anagnostopoulos I, et al.** Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. *N Engl J Med*, **1997**; 337:453.
106. **Ohno T, Stribley JA, Wu G, et al.** Clonality in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. *N Engl J Med*, **1997**; 337:459.
107. **Liso A, Capello D, Marafioti T, et al.** Aberrant somatic hypermutation in tumor cells of nodular-lymphocyte-predominant and classic Hodgkin lymphoma. *Blood*, **2006**; 108:1013.
108. **Schmitz R, Stanelle J, Hansmann ML, Küppers R.** Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annu Rev Pathol*, **2009**; 4:151.
109. **Brune V, Tiacci E, Pfeil I, et al.** Origin and pathogenesis of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma as revealed by global gene expression analysis. *J Exp Med*, **2008**; 205:2251.
110. **Mason D.Y, Banks P.M, Chan ., et al.** Nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease: a distinct clinicopathologic entity. *Am J Surg Pathol*, **1994**;18: 526-30
111. **Schmitz R, Stanelle J, Hansmann ML, Küppers R.** Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annu Rev Pathol*, **2009**; 4:151.
112. **Von Wasielewski R, Mengel M, Fischer R, et al.** Classical Hodgkin's disease. Clinical impact of the immunophenotype. *Am J Pathol*, **1997**; 151:1123.
113. **Zukerberg LR, Collins AB, Ferry JA, Harris NL.** Coexpression of CD15 and CD20 by Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Am J Pathol*, **1991**; 139:475.
114. **Schmid C, Pan L, Diss T, Isaacson PG.** Expression of B-cell antigens by Hodgkin's and Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol*, **1991**; 139:701.
115. **Von Wasielewski R, Werner M, Fischer R, et al.** Lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. An immunohistochemical analysis of 208 reviewed Hodgkin's disease cases from the German Hodgkin Study Group. *Am J Pathol*, **1997**; 150:793.
116. **Filippa, D.A., Ladanyi, M., Wollner, N., et al.** CD30 (Ki-1)-positive malignant lymphomas: clinical, immunophenotypic, histologic, and genetic characteristics and differences with Hodgkin's disease. *Blood*, **1996**; 87: 2905–17.
117. **Watanabe, K., Yamashita, Y., Nakayama, A., et al.** Varied B-cell immunophenotypes of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in classic Hodgkin's disease. *Histopathology*, **2000**; 36: 353–61.

118. **Carbone A, Gloghini A, Gattei V, et al.** Expression of functional CD40 antigen on Reed-Sternberg cells and Hodgkin's disease cell lines. *Blood*, **1995**; 85:780.
119. **Munro JM, Freedman AS, Aster JC, et al.** In vivo expression of the B7 costimulatory molecule by subsets of antigen-presenting cells and the malignant cells of Hodgkin's disease. *Blood*, **1994**; 83:793.
120. **Diepstra A, van Imhoff GW, Karim-Kos HE, et al.** HLA class II expression by Hodgkin Reed-Sternberg cells is an independent prognostic factor in classical Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, **2007**; 25:3101.
121. **Kanzler H, Küppers R, Hansmann ML, Rajewsky K.** Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med*, **1996**; 184:1495.
122. **Küppers R, Rajewsky K.** The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu Rev Immunol*, **1998**; 16: 471-493.
123. **Kanzler H, Küppers R, Hansmann M., Rajewsky K.,** Hodgkin and Reed-Sternberg Cells in Hodgkin's Disease represent the outgrowth of a dominant tumour clone derived from (crippled) germinal center B cells, *J. Exp. Med.* **1996**;184 , 1495- 1505.
124. **Marafioti T, Hummel M, Foss H, Laumen H, Korbjuhn P. Ve ark.** Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood*, **2000**;95 , 1443-1450.
125. **Schwering I, Brauninger A, Klein U, Jungnickel B, Tinguely M, Diehl V . ve ark.** Loss of the B-cell lineage specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma, *Blood*, **2003**; 101 1505-1512.
126. **Foss H, Reusch R, Demel G, Lenz G, Anagnostopoulos I, Hummel M, and Stein H.** Frequent expression of the B-cell specific activator protein in Reed- Sternberg cells of classical Hodgkin' disease provides further evidence for its B-cell origin, *Blood*, **1999**; 94, 3108-3113.
127. **Horie R, Watanabe T, Morishita Y, Ito K, Ishida T, Kanegae Y. Ve ark.** Ligand independent signaling by overexpressed CD 30 driven NF-kB activation in Hodgkin Reed-Sternberg cells, *Oncogene*, **2002**; 21, 2493-2503.
128. **Gruss H, Bolani N, Williams D, Armitage R, Smith C, Goodwin R .** Pleiotropic effects of the CD 30 ligand on CD-30 expressing cells and lymphoma cell lines, *Blood*, **1994**;, 83, 2045-2056.
129. **Sorg UR, Morse M, Patton WN, Hock BD, Angus HB, Robinson BA. Ve ark.** Hodgkin's cells Express CD83, a dendritic cell lineage associated antigen, *Pathology*, **1997**; 29, 294-299.
130. **Patrick A, Zweidler-McKay, Yiping He, Lanwel X, Carlos G,** Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies. *Blood*, **2005**;106 , 3898-3906
131. **Van den berg A, Visser L, Poppema S.** High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma, *Am. J. Pathol*, **1999**;154, 1685-1691.
132. **Küppers R, Hansmann M.** The Hodgkin and Reed/ Sternberg cell, *The International Journal of Biochemistry& Cell Biology*, **2005**;37 ,511-517.

133. **Thomas R , Re D, Wolf J , Diehi V.** Part I : Hodgkin's Lymphoma –molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells, *The Lancet Oncology*, **2004**;5, 11-18.
134. **Re D, Müschen M, Ahmadi T, Wickenhauser C, Jox A, Holtick U. Ve ark.** Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and reed Sternberg Celss. *Cancer research*, **2001**; 61 , 2080-2084.
135. **Kadin ME, Liebowitz DN.** Cytokine and cytokine receptors in Hodgkin's disease.In Mauch PM, Armitage JO, et al., eds Hodgkin's Disease Philadelphia:Lippincott Williams&Wilkins; **1999**: 139-157.
136. **Falini B, Bigerna B, Pasqualucci L, et al.** Distinctive expression pattern of the BCL-6 protein in nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. *Blood*, **1996**; 87:465.
137. **Carbone A, Gloghini A, Gaidano G, et al.** Expression status of BCL-6 and syndecan-1 identifies distinct histogenetic subtypes of Hodgkin's disease. *Blood*, **1998**; 92:2220.
138. **Stein H, Marafioti T, Foss HD, et al.** Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood*, **2001**; 97:496.
139. **Browne P, Petrosyan K, Hernandez A, Chan JA.** The B-cell transcription factors BSAP, Oct-2, and BOB.1 and the pan-B-cell markers CD20, CD22, and CD79a are useful in the differential diagnosis of classic Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol*, **2003**; 120:767.
140. **Poppema S, Kaleta J, Hepperle B.** Chromosomal abnormalities in patients with Hodgkin's disease: evidence for frequent involvement of the 14q chromosomal region but infrequent bcl-2 gene rearrangement in Reed-Sternberg cells. *J Natl Cancer Inst*, **1992**; 84:1789.
141. **M'kacher R, Bennaceur-Griscelli A, Girinsky T, et al.** Telomere shortening and associated chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes of patients with Hodgkin's lymphoma prior to any treatment are predictive of second cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **2007**; 68:465.
142. **Weber-Matthiesen K, Deerberg J, Poetsch M, et al.** Numerical chromosome aberrations are present within the CD30+ Hodgkin and Reed-Sternberg cells in 100% of analyzed cases of Hodgkin's disease. *Blood*, **1995**; 86:1464.
143. **Inghirami G, Macri L, Rosati S, et al.** The Reed-Sternberg cells of Hodgkin disease are clonal. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1994**; 91:9842.
144. **Ushmorov A, Leithäuser F, Sakk O, et al.** Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, **2006**; 107:2493.
145. **Carbone A, Gloghini A, Larocca LM, et al.** Human immunodeficiency virus-associated Hodgkin's disease derives from post-germinal center B cells. *Blood*, **1999**; 93:2319.
146. **Levine AM.** HIV-associated Hodgkin's disease. Biologic and clinical aspects. *Hematol Oncol Clin North Am*, **1996**; 10:1135.
147. **Audouin J, Diebold J, Pallesen G.** Frequent expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 in tumour cells of Hodgkin's disease in HIV-positive patients. *J Pathol*, **1992**; 167:381.
148. **Pelstring RJ, Zellmer RB, Sulak LE, et al.** Hodgkin's disease in association with human immunodeficiency virus infection. Pathologic and immunologic features. *Cancer*, **1991**; 67:1865.

149. **Opelz G, Henderson R.** Incidence of non-Hodgkin lymphoma in kidney and heart transplant recipients. *Lancet*, **1993**; 342:1514.
150. **Herndier BG, Sanchez HC, Chang KL, et al.** High prevalence of Epstein-Barr virus in the Reed-Sternberg cells of HIV-associated Hodgkin's disease. *Am J Pathol*, **1993**;142:1073.
151. **Jundt F, Anagnostopoulos I, Förster R, Mathas S, Stein H, Dörken B.** Activated Notch1 signalling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood*, **2002**; 99, 3398-3403.
152. **Renne C, Willenbrock K, Küppers R, Hansmann M, Brauninger A.** Autocrine an paracrine activated receptor tyrosine kinases in classic Hodgkin lymphoma, *Blood*, **2005**;105 , 4051-4059.
153. **Teofilli L, Febo A, Pierconti F, Maggino N, Bendandi M, Rutella S, et al.** Expression of the c-met proto-oncogene and its ligand , hepatocyte growth factor, in Hodgkin disease. *Blood*, **2001**; 97 , 1063-1069.
154. **Dutton A, Reynolds G, Dawson C, Young L, Murray P.** Constitutive activation of phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cell through a mechanism involving Akt kinase and mTOR. *J. Pathol*, **2005**; **205**, 498-506.
155. **Georgakis G, Li Y, Rassidakis G, Medeiros, Mills G, Younes A.** Inhibition of the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt promotes G1 cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma, *British Journal of Hematology*, **2005**; 132, 503-511.
156. **Zheng B, Flumara P, Li Y, Georgakis G, Snell V, Younes M. et al.** MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival, *Blood*, **2003**;102, 1019-1027.
157. **Bonizzi G, Karin M.** The two NF- κ B activation pathways and their role innate and adaptive immunity, *Trends in immunology*. **2004**; 25,280-288.
158. **Bargou R, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara M, Arnold W. et al.** Constitutive nuclear factor κ B –RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells, *J. Clin. Invest*, **1997**;100,2961-2969.
159. **Carbone A, Gloghini A, Gattl V, Aldinucci D, Degan M, Paoli P. et al.** Expression of functional CD 40 antigen on Reed-Sternberg cells and Hodgkin 's disease cell lines. *Blood*, **1995**;85, 780-789.
160. **Horie R, Watanabe T, Morishita Y, Ito K, Ishida T, Kanegae Y. et al.** Ligand independent signaling by over expressed CD30 drives NF- κ B activation in Hodgkin Reed-Sternberg cells, *Oncogene*, **2002**; 21,2493-2503.
161. **Joos S, Menz C, Wrobel G, Siebert R, Gesk S, Ohl S. et al.** Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood*, **2002**;99, 1381-1387.
162. **Cabannes E, Khan G, Aillet F, Jarret R, Hay R.** Mutations in the I κ B α gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I κ B α , *Oncogene*, **1999**;18, 3063-3186.
163. **Emmerich F, Meiser M, Hummel M, Demel G, Foss H, Jundt F, Mathas S. et al.** Overexpression of I Kappa B Alpha without inhibition of NF- κ B activity and mutations in the I Kappa B Alpha gene in Reed-Sternberg cells, *Blood*, **1999**; 94, 3129-3134.

164. **Emmerich F, Theurich J, Hummel M, Haefliger A, Vry M, Dohner K. Ve ark.** Inactivating IKB α mutations in Hodgkin's /Reed-Sternberg cell, *J. Pathol*, **2003**; 201, 413-420.
165. **Pallesen G, Dutoit S, Rowe M, Young L.** Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease, *The Lancet*. **1991**; 337, 320-322.
166. **Chen H, Lee J, Zong Y, Borowitz M, NG M, Ambinder R. Ve ark.** Linkage between STAT regulation and Epstein-Barr virus gene expression in tumors, *J. Virol*, **2001**;75, 2929-2937.
167. **Gries O, Strobl U, Gonnella R, Ueffing M, Marschall G, Zeidler, Pich D, Hammerschmidt W.** Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics constitutively active receptor molecule, *The EMBO Journal*. **1997**; 16,6131-6140.
168. **Kliger E, Kieser A, Baumann M, Hammerschmidt W.** Epstein-Barr virus mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor, *The EMBO Journal*, **1998**; 17, 1700-1709.
169. **Devergne O, MCFarland, Mosialos G, Izumi K, Ware C, Kieff E.** Role of the TRAF binding site and NF-kappaB activation in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-induced cell gene expression, *J. Virology*, **1998**; 72, 7900-7908.
170. **Cadwell RC, Wilson JB, Anderson AJ, Longnecker R.** Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B-cell receptor signals, *Immunity*, **1998**; 9, 405-411.
171. **Cochet O, Frelin C, Peyron J, Imbert V.** Constitutive activation of STAT proteins in the HDLM-2 and L540 Hodgkin lymphoma derived cell lines supports cell survival. *Cellular signalling*, **2005**;18, 449-455.
172. **Kube D, Holtick U, Vockerodt M, Ahmadi T, Hailer B. Behrmann I, Heinrich P, Diehl V, Tesch H.** STAT 3 constitutively activated in Hodgkin cell lines, *Blood*, **2001**; 98, 762-770.
173. **Skinnider B, Elia A, Gascoyne R, Patterson B, Trümper, Kapp U, Mak T.** Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma, *Blood*, **2002**;99,618-626.
174. **Holtick U, Vockerodt M, Pinkert D, Schoof N, Stürzenhofecker B, Kusebbi N. Ve ark.** STAT 3 is essential for Hodgkin lymphoma cell proliferation and is a target of typhostin AG17 which confers sensitization for apoptosis, *Leukemia*, **2005**; 19, 936-944.
175. **Kapp U, Yeh W, Patterson B, Elia A, Kagi D, Ho A. Ve ark.** Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J. Exp. Med.* **1999**; 189, 1939-1945.
176. **Skinnider B, Elia A, Gascoyne R, Trümper L, Bonin F, Kapp U, ve ark.** Interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma, *Blood*, **2001**;97, 250-255.
177. **Shaulian E, Karin M.** AP-1 as a regulator of cell life and death, *Nature Cell Biology*, **2002**; 4, E131-E136.
178. **Mathas S, Hinz M, Anagnostopoulos I, Krappmann D, Lietz A, Jundt F, Bommert K, ve ark.** Aberrantly expressed c-Jun and Jun B are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize NF- κ B, *The EMBO Journal*. **2002**; 21. 4104-4113.

179. Klinik Gelişim, İstanbul Tabib Odası Süreli Bilimsel Yayını. **2007**; CİLT 20, Sayı:2, 66.
180. **Yahalom J, Straus D**, Hodgkin's lymphoma. In: **Pazdur R, Coia LR, Hoskins WJ, Wagman LD**, editors. Cancer management: a multidisciplinary approach. 9th ed. Lawrence, KS: *CMP Healthcare Media*; **2005**; p. 675.
181. **Philip Lanzkowsky**. *Manuel of Pediatric Hematology and Oncology*, 4 th ed.**2005** (453-490).
182. **Donaldson SS, Hudson M, Oberlin O, et al**. Pediatric Hodgkin's disease. In: **Mauch PM, Armitage JO, Diehl V, et al**, eds. *Hodgkin's disease*. Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins, **1999**; 531-605 68.
183. **Rosen PJ, Lavey Rs, Haskell CM**. Hodgkin's Disease In: **Haskell CM** (ed). *Cancer Treatment*. 4.th ed. Philadelphia. W.B. Saunder Company. **1995**; 951-979.
184. **DeVita VT, Mauch PM, Harris NL**. Hodgkin's Disese In: **DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA** (eds). *Cancer Principles and Practice of Oncology*. 5th ed. Philadelphia, Lippincolt-Raven **1997**; 2242-2283.
185. **Stein RS**. Hodgkin's Disease. In: **Lee RG, Foerster F, Lukens J et al**. (eds). *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10th ed Egypt. Mass Pub. **1999**; 2538-2571.
186. **Uccini S, Monardo F, Stoppacciaro A, et al**. High frequency of Epstein-Barr virus genomedetection in Hodgkin's disease of HIV-positive patients. *Int J Cancer* **1990**; 46: 581-595.
187. **Philip A Pizzo, David G**. *Poplock Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Third Edition Lippincott Raven p. **1997** 523-543.
188. **Regula DP Jr, Hoppe RT, Weiss LM**. Nodular and diffuse types of lymphocyte predominance Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. **1988**; 318:214.
189. **Mauch PM, Kalish LA, Kadin M, et al**. Patterns of presentation of Hodgkin disease. Implications for etiology and pathogenesis. *Cancer*, **1993**; 71:2062.
190. **Borg-Grech A, Radford JA, Crowther D, et al**. A comparative study of the nodular and diffuse variants of lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* **1989**; 7:1303.
191. **Shimabukuro-Vornhagen A, Haverkamp H, Engert A, et al**. Lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma: clinical presentation and treatment outcome in 100 patients treated within German Hodgkin's Study Group trials. *J Clin Oncol*, **2005**; 23:5739.
192. **Khoury JD, Jones D, Yared MA, et al**. Bone marrow involvement in patients with nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *Am J Surg Pathol*, **2004**; 28:489.
193. **Mason DY, Banks PM, Chan J, Cleary ML, Delsol G, Harris NL et al**. Noduler lymphocyte predominance Hodgkin's disease. A distinct clinicopathological entity. *Am J Surg Pathol*, **1994**; 18: 526-530.
194. **Horning JH**. Hodgkin Lymphoma. In: **Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U**. (eds). *Williams Hematology*. 6th ed. McGraw-hill. **2001**; 1215-1235.
195. **Bernhards J, Fischer R, Hubner K, et al**. Histopatological classification of Hodgkin's Lymphoma. Results from the reference pathology of the German Hodgkin's trial. *Annals of Oncology* **1992**; 3(4):31-33.

196. **Kaplan HS.** *Hodgkin's disease*, 2nd ed. Cambridge: Harvard University Press, **1980**.
197. **Martin D, Abeloff, James O, Armitage, Allen S, Lichter, John E.** Niederhuber, *Clinical Oncology*, second edition, **2000**; 2620-2657.
198. **Xiros N, Binder T, Anger B, et al.** Idiopathic thrombocytopenic purpura and autoimmune hemolytic anemia in Hodgkin's disease. *Eur J Haematol*, **1988**;40: 437-441.
199. **Gobbi PG, Cavalli C, Gendarini A, et al.** Reevaluation of prognostic significance of symptoms in Hodgkin's disease. *Cancer*, **1985**;56: 2874-2880.
200. **DeVita VT Jr, Mauch PM, Haris NL,** Hodgkin's disease. In: **DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA,** editors. *Cancer Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, **1997**; 2242-2283.
201. **Hicks J, Flaitz C.** Progressive transformation of germinal centers: review of histopathologic and clinical features. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, **2002**; 65:195.
202. **Verma A, Stock W, Norohna S, et al.** Progressive transformation of germinal centers. Report of 2 cases and review of the literature. *Acta Haematol*. **2002**; 108:33.
203. **Boudová L, Torlakovic E, Delabie J, et al.** Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma with nodules resembling T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma: differential diagnosis between nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma and T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma. *Blood*, **2003**; 102:3753.
204. **De Jong D, Bosq J, MacLennan KA, et al.** Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma (LRCHL): clinico-pathological characteristics and outcome of a rare entity. *Ann Oncol*, **2006**; 17:141.
205. **Philip A Pizzo, David G.** *Poplock Principles and Practice of Pediatric Oncology*. **1997** Third Edition Lippincott Raven p. 523-543.
206. **Von Wasielewski, R., Mengel, M., Fischer, R., et al.** Classical Hodgkin's disease: clinical impact of the immunophenotype. *Am J Pathol*, **1997**; 151: 1123-30.
207. **Hall, P.A, D'Ardenne, A.J.** Value of CD15 immunostaining in diagnosing Hodgkin's disease: a review of published literature. *J Clin Pathol*, **1991**; 40: 1298-304.
208. **Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, et al.** Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res*, **1971**; 31:1860.
209. **Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, et al.** Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol* **1989**; 7:1630.
210. **Specht L.** Prognostic Factors in Hodgkin's Disease. *Semin Radiat Oncol*, **1996**; 6:146.
211. **Crnkovich MJ, Hoppe RT, Rosenberg SA.** Stage IIB Hodgkin's disease: the Stanford experience. *J Clin Oncol*, **1986**; 4:472.
212. **Crnkovich MJ, Leopold K, Hoppe RT, Mauch PM.** Stage I to IIB Hodgkin's disease: the combined experience at Stanford University and the Joint Center for Radiation Therapy. *J Clin Oncol* **1987**; 5:1041.

213. **Gobbi PG, Cavalli C, Gendarini A, et al.** Reevaluation of prognostic significance of symptoms in Hodgkin's disease. *Cancer*, **1985**; 56:2874.
214. **Thar TL, Million RR, Hausner RJ, McKetty MH.** Hodgkin's disease, stages I and II: relationship of recurrence to size of disease, radiation dose, and number of sites involved. *Cancer*, **1979**; 43:1101.
215. **Fabian CJ, Mansfield CM, Dahlberg S, et al.** Low-dose involved field radiation after chemotherapy in advanced Hodgkin disease. A Southwest Oncology Group randomized study. *Ann Intern Med*, **1994**; 120:903.
216. **Bartlett NL, Rosenberg SA, Hoppe RT, et al.** Brief chemotherapy, Stanford V, and adjuvant radiotherapy for bulky or advanced-stage Hodgkin's disease: a preliminary report. *J Clin Oncol*, **1995**; 13:1080.
217. **Friedberg, J.W, Fischman, A, Neuberg, D, et al.** FDG-PET is superior to gallium scintigraphy in staging and more sensitive in the follow-up of patients with de novo Hodgkin lymphoma: a blinded comparison. *Leuk Lymphoma*, **2004**; 45: 85-92.
218. **Advani RH, Horning SJ.** Treatment of early-stage Hodgkin's disease. *Semin Hematol*, **1999**; 36:270.
219. **Ng AK, Weeks JC, Mauch PM, Kuntz KM.** Decision analysis on alternative treatment strategies for favorable-prognosis, early-stage Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*, **1999**; 17:3577.
220. **Ng AK, Weeks JC, Mauch PM, Kuntz KM.** Laparotomy versus no laparotomy in the management of early-stage, favorable-prognosis Hodgkin's disease: a decision analysis. *J Clin Oncol*, **1999**; 17:241.
221. **Advani RH, Horning SJ.** Treatment of early-stage Hodgkin's disease. *Semin Hematol*, **1999**; 36:270.
222. **Aisenberg AC.** Problems in Hodgkin's disease management. *Blood*, **1999**; 93:761.
223. **Philip Lanzkowsky.** *Manuel of Pediatric Hematology and Oncology*, 4 th ed.**2005** (453-490).
224. **Hasenclever D, Diehl V.** A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med*, **1998**; 339: 1506–14.
225. **Dienstbier Z, Chytrý P, Hermanská Z, et al.** A multivariate analysis of prognostic factors in adult Hodgkin's disease. *Neoplasma*, **1989**; 36: 447-56.
226. **Klimm B, Reineke T, Haverkamp H. et al.** Role of hematotoxicity and sex in patients with Hodgkin's lymphoma: an analysis from the German Hodgkin Study Group. *J Clin Oncol*, **2005**; 23: 8003-11.
227. **Specht L, Nissen N.I.,** Prognostic factors in Hodgkin's disease stage III with special reference to tumour burden. *Eur J Haemato*, **1988**; 41: 80-7.
228. **Straus D.J, Gaynor J.J, Myers J, et al.** Prognostic factors among 185 adults with newly diagnosed advanced Hodgkin's disease treated with alternating potentially noncross- resistant chemotherapy and intermediate-dose radiation therapy. *J Clin Oncol*, **1990**; 8: 1173-86.

229. **Wiedmann E, Baica, B, Hertel A, et al.** Positron emission tomography (PET) for staging and evaluation of response to treatment in patients with Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma*, **1999**; 34: 545–51.
230. **Diehl V, Brilliant C, Franklin J, et al.** BEACOPP Chemotherapy for Advanced Hodgkin's Disease: Results of Further Analyses of the HD9- and HD12-Trials of the German Hodgkin Study Group (GHSG). *Blood*, **2004**; 104:307a.
231. **Bartl R, Frisch B, Burkhardt R., et al.** Assessment of bone marrow histology in Hodgkin's disease: correlation with clinical factors. *Br J Haematol*, **1982**; 51:345-60.
232. **Bonadonna, G, Valagussa, P, Santoro A.** Alternating non-cross-resistant combination chemotherapy or MOPP in stage IV Hodgkin's disease. A report of 8-year results. *Ann Intern Med*, **1986**; 104: 739-46.
233. **Cleary S, Link M, Danoldson S.** Hodgkin disease in the very young. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **1994**; 28:77-84.
234. **Edward C. Holphin, Louis S. Constine, Nancy J. Tarbell, Lary E. Kun,** *Pediatric Radiation Oncology third edition*, **1999**, p 203-232.
235. **Specht L.** Prognostics factors in Hodgkin's disease. *Sem Radiat Oncol*, **1996**;6:146-161.
236. **Hasenclever D, Diehl V.** A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med*, **1998**; 339:1506.
237. **Moccia AA, Donaldson J, Chhanabhai M, et al.** International Prognostic Score in Advanced-Stage Hodgkin's Lymphoma: Altered Utility in the Modern Era. *J Clin Oncol*, **2012**; 30:3383.
238. **Bierman PJ, Lynch JC, Bociek RG, et al.** The International Prognostic Factors Project score for advanced Hodgkin's disease is useful for predicting outcome of autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Oncol*, **2002**; 13:1370.
239. **Cosset JM, Henry-Amar M, Meerwaldt JH, et al.** The EORTC trials for limited stage Hodgkin's disease. The EORTC Lymphoma Cooperative Group. *Eur J Cancer*, **1992**; 28A:1847.
240. **Specht L, Nordentoft AM, Cold S, et al.** Tumor burden as the most important prognostic factor in early stage Hodgkin's disease. Relations to other prognostic factors and implications for choice of treatment. *Cancer* **1988**; 61:1719.
241. **Hoppe RT, Coleman CN, Cox RS, et al.** The management of stage I--II Hodgkin's disease with irradiation alone or combined modality therapy: the Stanford experience. *Blood*, **1982**; 59:455.
242. **Mauch P, Tarbell N, Weinstein H, et al.** Stage IA and IIA supradiaphragmatic Hodgkin's disease: prognostic factors in surgically staged patients treated with mantle and paraaortic irradiation. *J Clin Oncol*, **1988**; 6:1576.
243. **Mauch P, Goodman R, Hellman S.** The significance of mediastinal involvement in early stage Hodgkin's disease. *Cancer*, **1978**; 42:1039.
244. **Leopold KA, Canellos GP, Rosenthal D, et al.** Stage IA-IIB Hodgkin's disease: staging and treatment of patients with large mediastinal adenopathy. *J Clin Oncol*, **1989**; 7:1059.

245. **Schomberg PJ, Evans RG, O'Connell MJ, et al.** Prognostic significance of mediastinal mass in adult Hodgkin's disease. *Cancer*, **1984**; 53:324.
246. **Hughes-Davies L, Tarbell NJ, Coleman CN, et al.** Stage IA-IIB Hodgkin's disease: management and outcome of extensive thoracic involvement. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **1997**; 39:361.
247. **Mauch P, Gorshein D, Cunningham J, Hellman S.** Influence of mediastinal adenopathy on site and frequency of relapse in patients with Hodgkin's disease. *Cancer Treat Rep*, **1982**; 66:809.
248. **Mendenhall NP, Cantor AB, Barré DM, et al.** The role of prognostic factors in treatment selection for early-stage Hodgkin's disease. *Am J Clin Oncol*, **1994**; 17:189.
249. **Bonadonna G, Valagussa P, Santoro A.** Prognosis of bulky Hodgkin's disease treated with chemotherapy alone or combined with radiotherapy. *Cancer Surv* **1985**; 4:439.
250. **Roach M 3rd, Brophy N, Cox R, et al.** Prognostic factors for patients relapsing after radiotherapy for early-stage Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*, **1990**; 8:623.
251. **Healey EA, Tarbell NJ, Kalish LA, et al.** Prognostic factors for patients with Hodgkin disease in first relapse. *Cancer*, **1993**; 71:2613.
252. **Mauch PM, Kalish LA, Marcus KC, et al.** Long-term survival in Hodgkin's disease relative impact of mortality, second tumors, infection, and cardiovascular disease. *Cancer J Sci Am*, **1995**; 1:33.
253. **Henry-Amar M.** Second cancers after radiotherapy and chemotherapy for early stages of Hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst*, **1983**; 71:911.
254. **Pedersen-Bjergaard J, Larsen SO.** Incidence of acute nonlymphocytic leukemia, preleukemia, and acute myeloproliferative syndrome up to 10 years after treatment of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* **1982**; 307:965.
255. **Crnkovich MJ, Leopold K, Hoppe RT, Mauch PM.** Stage I to IIB Hodgkin's disease: the combined experience at Stanford University and the Joint Center for Radiation Therapy. *J Clin Oncol* **1987**; 5:1041.
256. **Anderson H, Deakin DP, Wagstaff J, et al.** A randomised study of adjuvant chemotherapy after mantle radiotherapy in supradiaphragmatic Hodgkin's disease PS IA-IIB: a report from the Manchester lymphoma group. *Br J Cancer* **1984**; 49:695.
257. **Tubiana M, Henry-Amar M, Hayat M, et al.** The EORTC treatment of early stages of Hodgkin's disease: the role of radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **1984**; 10:197.
258. **Pusey W.** Cases of sarcomes and Hodgkin's disease treated by exposures to x rays :a preliminary report. *JAMA* **1902**; 38:166-170.
259. **Goodman LS, Wintrobe MM, Dameshek W, et al.** Use of methyl-bis (betachloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *JAMA*, **1946**; 251: 2255-2261.
260. **Devita VT Jr, Canellos OP, Moksley JH.** A Decade of combination chemotherapy in the treatment of advanced Hodgkin's disease. *Cancer* **1972**; 30: 1495-1504.

261. **Santoro A, Bonadonna G, Valagussa P, et al.** Long term results of combined chemotherapy approach in Hodgkin's disease: superiority of ABVD plus radiotherapy versus MOPP plus radiotherapy. *J Clin Oncol* **1987**; 5: 27-37.
262. **Shan K, Lincoff AM, Young JB.** Anthracyclin induced cardiotoxicity *Ann Intern Med* **1996**; 125: 47-58.
263. **Hoppe RT.** Treatment planning in the radiation therapy of Hodgkin's disease. *Front Radiat Ther Oncol* **1987**; 21: 270-287.
264. **Bonadonna G, Zucali R, Monfardini S,** Combination Chemotherapy of Hodgkin Disease with Adriamycin, Bleomycin, Vinblastine and Imidazolizolecarboxamide versus MOPP. *Cancer* **1975**, 36:252-259.
265. **Canellos G.P, Anderson J.R,** Chemotherapy of Advanced Hodgkin Disease with MOPP, ABVD or MOPP Alternating with ABVD. *N Eng J Med.* **1992**; 327:1478-1484.
266. **Duggan D.B, Petroni G.R.,** Randomized Comparison of ABVD and MOPP / ABV hybrid for the Treatment of Advanced Hodgkin's Disease: Report of an Intergroup Trial. *J Clin Oncol.* **2003**; 21: 607-614.
267. **Santoro A, Bonadonna G, Valagusse P.** Lung Tern Results of Combined Chemoterapy-Radiotherapy approach in Hodgkin's Disease: Superiority of ABVD Plus Radiotherapy Versus MOPP Plus Radiiotherapy. *J. Clin Oncol* **1987**;5:27-37
268. **Eghbali H, Bonichon F, David B.** Combination of ABVD and radiotherapy in Early Stages of Hodgkin Disease: Analysis of a Series of 94 Patients. *Radiother. Oncol* **1990**;18: 127-136
269. **Pres O, LeBlanc M, Lichter A, et al.** Phase III randomized intergroup trial of subtotal lymphoid irradiation versus doxorubicin, vinblastine, and subtotal lymphoid irradiation for stage IA to IIA Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*, **2001**;19: 4238-44.
270. **Horning, S.J., Hoppe, R.T., Advani, R., et al.** Efficacy and late effects of Stanford V chemotherapy and radiotherapy in untreated Hodgkin's disease: mature data in early and advanced stage patients. *Blood*, **2004**; 104: 308 (abstract).
271. **Carde, Noordijk, E.M, Hagenbeek, A, et al.** Superiority of EBVP chemotherapy in combination with involved field irradiation over subtotal nodal irradiation in favor-able clinical stage I-II Hodgkin's disease: The EORTC/GPMC H7F randomized trial. *Proc Am Soc Clin Oncol*, **1997**; 16: 13 (abstract)
272. **Diehl V, Brilliant C, Engert A, et al,** Reduction of combined modality treatment intensity in early stage Hodgkin's lymphoma, interim analysis of HD10 trial of GHSG. *Eur J Haematol*, **2004**;73:E03a
273. **Campbell, B.A., Voss, N., Pickles, T., et al.** Involved-nodal radiation therapy as a component of combination therapy for limited-stage Hodgkin's lymphoma: a question of field size. *J Clin Oncol*, **2008**; 26:5170-4.
274. **Carde P, Hagenbeek A, Hayat M, et al.** Clinical staging versus laparotomy and combined modality with MOPP versus ABVD in early-stage Hodgkin's disease: the H6 twin randomized trials from the European Organization for Research and Treatment of Cancer Lymphoma Cooperative Group. *J Clin Oncol*, **1993**; 11: 2258-72.

275. **Horning S.J, Rosenberg S.A, Hoppe R.T.** Brief chemotherapy (Stanford V) and adjuvant radiotherapy for bulky or advanced Hodgkin's disease: an update. *Ann Oncol*, **1996**; 7 (Suppl 4): 105–8.
276. **Sieber, M., Tesch, H., Pfistner, B., et al.** Rapidly alternating COPP/ABV/IMEP is not superior to conventional alternating COPP/ABVD in combination with extended-field radiotherapy in intermediate-stage Hodgkin's lymphoma: final results of the German Hodgkin's Lymphoma Study Group Trial HD5. *J Clin Oncol*, **2002**;20: 476–84.
277. **Engert A, Schiller P, Jostin A, et al.** German Hodgkin's Lymphoma Study Group. Involved-field radiotherapy is equally effective and less toxic compared with extended-field radiotherapy after four cycles of chemotherapy in patients with early-stage unfavorable Hodgkin's lymphoma: results of the HD8 trial of the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol*, **2003**;21: 3601–8.
278. **Fermé C., Eghbali H, Hagenbeek A.** MOPP/ABV (M/A) hybrid irradiation in unfavorable supradiaphragmatic clinical stages I–II HD: comparison of three treatment modalities, preliminary results of the EORTC-GELA H8-U randomized trial in 995 patients. *Blood*, **2000**; 96: 576a.
279. **Canellos G, Anderson J, Propert. K.** Chemotherapy of advanced Hodgkin's disease with MOPP, ABVD, or MOPP alternating with ABVD. *N Eng J Med* **1992**;327: 1478-1484
280. **Glick, J.H., Young, M.L., Harrington, D., et al.** MOPP/ABV hybrid chemotherapy for advanced Hodgkin's disease significantly improves failure-free and overall survival: the 8-year results of the intergroup trial. *J Clin Oncol*, **1998**;16: 19–26.
281. **Duggan D.B, Petroni G.R, Johnson, J.L, et al** Randomized comparison of ABVD and MOPP/ABV hybrid for the treatment of advanced Hodgkin's disease: report of an intergroup trial. *J Clin Oncol*, **2003**; 21: 607-14.
282. **Gobbi, P.G., Levis, A., Chisesi, T., et al.** Intergruppo Italiano Linfomi. ABVD versus modified stanford V versus MOPPEBVCAD with optional and limited radiotherapy in intermediate- and advanced-stage Hodgkin's lymphoma: final results of a multicenter randomized trial by the Intergruppo Italiano Linfomi. *J Clin Oncol*, **2005**;23:9198–207.
283. **Diehl V, Franklin, J, Pfreundschuh M, et al.** German Hodgkin's Lymphoma Study Group. Standard and increased-dose BEACOPP chemotherapy compared with COPP-ABVD for advanced Hodgkin's disease. *N Engl J Med*, **2003**; 348:2386–95.
284. **Diehl V, Brilliant C, Franklin J, et al.** BEACOPP Chemotherapy for Advanced Hodgkin's Disease: Results of Further Analyses of the HD9- and HD12-Trials of the German Hodgkin Study Group (GHSG). *Blood*, **2004**; 104:307a.
285. **Aleman, B.M, Raemaekers J.M, Tirelli U, et al.** European Organization for Research and Treatment of Cancer Lymphoma Group. Involved-field radiotherapy for advanced Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, **2003**;348: 2396–2406.
286. **Horning, S.** Hodgkin's disease. In Cavalli F, Hansen HH, Kaye S (eds): Textbook of Medical Oncology, 2nd edition. London: Martin Dunitz Publishers, **2000**; 461–74.
287. **Diehl V. Mauch P. M, Harris N.L.** *Hodgkin's disease*. In De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds): Principles and Practice of Oncology, 6th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins **2001**;2339– 86.

288. **Longo, D, Duffey P, Young R, et al.** Conventional-dose salvage combination chemotherapy in patients relapsing with Hodgkin's disease after combination chemotherapy: the low probability for cure. *J Clin Oncol*, **1992**; 10: 210-8.
289. **Bonfante V, Santoro A, Viviani S, et al.** Outcome of patient with Hodgkin's disease failing after primary MOPP/ABVD. *J Clin Oncol*, **1997**; 15: 528-34.
290. **Fermé C, Mounier N, Diviné M, et al.** Intensive salvage therapy with high-dose chemotherapy for patients with advanced Hodgkin's disease in relapse or failure after initial chemotherapy: results of the Groupe d'Étude des Lymphomes de l'Adulte H89 Trial. *J Clin Oncol*, **2002**; 20: 467–75.
291. **Josting A, Rueffer U, Franklin J, et al.** Prognostic factors and treatment outcome in primary progressive Hodgkin's lymphoma: a report from the German Hodgkin Lymphoma Study Group. *Blood*, **2000**; 96: 1280–6.
292. **Pfreundschuh M, Rueffer U, Lathan B, et al.** , Dexamethasone-BEAM in patients with Hodgkin's disease refractory to multidrug chemotherapy regimens: a trial of the German Hodgkin's Disease Study Group. *J Clin Oncol*, **2002**; 12: 580–6.
293. **Fermé, C., Bastion, Y., Lepage, E., et al.** The MINE regimen as intensive salvage chemotherapy for relapsed and refractory Hodgkin's disease. *Ann Oncol*. **1995**; 6:543-9
294. **Rodriguez, J., Rodriguez, M.A., Fayad, L., et al.** ASHAP: a regimen for cytoreduction of refractory or recurrent Hodgkin's disease. *Blood*, **1999**; 93: 3632–6
295. **Linch, D., Winfield, D., Goldstone, A., et al.** Dose intensification with autologous bone-marrow transplantation in relapsed and resistant Hodgkin's disease: results of a BNLI randomised trial. *Lancet*, **1993**; 341: 1051–4
296. **Schmitz, N., Sextro, M., Pfistner, B., et al.** HDR-1: high-dose therapy (HDT) followed by hematopoietic stem-cell transplantation (HSCT) for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease (HD): final results of a randomised GHSG and EBMT trial (HD-R1). *Proc Am Soc Clin Oncol*, **1999**; 18: a 5 (abstract)
297. **Devizzi, L., Santoro, A., Bonfante, V., et al.** Vinorelbine: an active drug for the management of patients with heavily pretreated Hodgkin's disease. *Ann Oncol*. **1994**; 5: 817-20
298. **Santoro, A., Bredenfeld, H., Devizzi, L., et al.** Gemcitabine in the treatment of refractory Hodgkin's disease: results of a multicenter phase II study. *J Clin Oncol*, **2000**; 18: 2615-9
299. **Rehwald, U., Schulz, H., Reiser, M., et al.** Treatment of relapsed CD20+ Hodgkin lymphoma with the monoclonal antibody rituximab is effective and well tolerated: results of a phase 2 trial of the German Hodgkin Lymphoma Study Group. *Blood*, **2003**; 101: 420-4
300. **Ekstrand, B.C., Lucas, J.B., Horwitz, S.M., et al.** Rituximab in lymphocyte-predominant Hodgkin disease: results of a phase 2 trial. *Blood*; **2003**; 101: 4285-9
301. **Nogová, L., Reineke, T., Eich, H.T., et al.** Extended field radiotherapy, combined modality treatment or involved field radiotherapy for patients with stage IA lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma: a retrospective analysis from the German Hodgkin Study Group (GHSG). *Ann Oncol*, **2005**; 16: 1683-7
302. **Schlembach, P.J., Wilder, R.B., Jones, D., et al.** Radiotherapy alone for lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. *Cancer J*, **2002**; 8: 377-83.

303. Wilder, R.B.,Schlembach, P.J., Jones, D., et al. European Organization for Research and Treatment of Cancer and Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte very favorable and favorable, lymphocyte predominant Hodgkin disease. *Cancer*, **2002**; 94:1731-8
304. Schmitt M. *Cancer testis/germline antigens (CT/CG-antigens) in leukemias*. Leukemia Research 31 **2007**;1–3
305. Sigalotti L, Fratta E, Coral S, Tanzarella S, Danielli R, Colizzi F, Fonsatti E, Traversari C, Altomonte M, Maio M. Intratumor Heterogeneity of Cancer/Testis Antigens Expression in Human Cutaneous Melanoma Is Methylation-Regulated and Functionally Reverted by 5-Aza-2_-deoxycytidine. *Cancer Research* 64, 9167–9171, December 15, **2004**
306. Meklat F, Li Z, Wang Z, Zhang Y, Zhang J, Jewell A, H Lim S. Cancer-testis antigens in haematological malignancies Journal Compilation **2007** Blackwell Publishing Ltd, *British Journal of Haematology*. **2006**;1365-2141
307. Simpson, A.J., Caballero, O.L., Jungbluth, A., Chen, Y.T. & Old, L.J. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature Reviews Cancer*, **2005**;5, 615–625.
308. Ikeda H, Lethe B, Lehmann F, van Baren N, Baurain JF, de Smet C, Chambost H, Vitale M, Moretta A, Boon T, Coulie PG. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* **1997**; 6: 199-208.
309. Paydaş S, Tanrıverdi K, Yavuz S, Şeydaoğlu G. PRAME mRNA levels in cases with chronic leukemia: clanical importance and review of the literature. *Leuk Res*, **2007**;31:365-9.
310. Yin B. PRAME: From diagnostic marker and tumor antigen to promising target of RNAi therapy in leukemic cells. *Leuk Res*. **2011** Sep;35(9):1159-60.
311. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **2000**;25:169–93.
312. Kawasaki K, Minoshima S, Nakato E, Shibuya K, Shintani A, Schmeits JL, Wang J, Shimizu N: One-megabase sequence analysis of the human immunoglobulin lambda gene locus. *Genome Res* **1997**;7:250-261.
313. Proto-Siqueira R, Figueiredo-Pontes LL, Panepucci RA. PRAME is a membrane and cytoplasmic protein aberrantly expressed in chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Leuk Res*, **2006**;30:1333-1339
314. Lethe B, van der Bruggen P, Brasseur F, Boon T. MAGE-1 expression threshold for the lysis of melanoma cell lines by a specific cytotoxic T lymphocyte. *Melanoma Res*, **1997**; 7(Suppl 2): S83-88.
315. Van Baren N, Chambost H, Ferrant A, Michaux L, Ikeda H, Millard I, Olive D, Boon T, Colulie PG. PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells is expressed in acute leukemia cells. *Br J Haematol*, **1998**;102: 1376-1379.
316. Greiner J, Ringhoffer M, Simikopinko O, Szmargowska A, Huebsch S, Maurer U, Bergmann L, Schmitt M. Simultaneous expression of different immunogenic antigens in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*, **2000**;28: 1413-1422.

317. Matsushita M, Ikeda H, Kizaki M, Okamoto S, Osagawara M, Ikeda Y, Kawakami Y. Quantitative monitoring of the PRAME gene for the detection of minimal residual disease in leukemia. *Br J Haematol*, **2001**; 112: 916-926.
318. Proto-Siqueira R, Falcao RP, Souza CA, Ismael SJ, Zago MA. The expression of PRAME in chronic lymphoproliferative disorders. *Leuk Res*, **2003**; 27: 393-396.
319. Steinbach D, Hermann J, Viehmann S, Zintl F, Gruhn B. Clinical implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* **2002**;133: 118-123.
320. Paydaş S, Tanriverdi K, Yavuz S, Disel U, Başlamışlı F, Burgut R. PRAME mRNA levels in cases with acute leukemia: clinical importance and future prospects. *J. Hematol.* **2005**;79; 257-261
321. Li CM, Guo M, Borczuk A. Gene expression in Wilm's tumour mimics the earliest committed event in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *Am J Pathol*, **2002**;160:2181-2190.
322. Schenk T, Stengel S, Goellner S, Steinbach D, Saluz HP. Hypomethylation of PRAME Is Responsible for Its Aberrant Overexpression in Human Malignancies Genes Chromosomes, *Cancer*. **2007 Sep**;46(9):796-804.
323. Haqq C, Nosrati M, Sudilovsky D. The gene expression signatures of melanoma progression. *Proc Natl Acad Sci USA* **2005**;102:6092-7.
324. Neumann E, Engelsberg A, Decker J, Storkel S, Jaeger E, Huber C, Seliger B. Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies? *Cancer Res*, **1998**; 58: 4090-4095.
325. Boon K, Edwards JB, Siu IM, Olschner D, Eberhart CG, Marra MA, Strausberg RL, Riggins GJ. Comparison of medulloblastoma and normal neural transcriptomes identifies a restricted set of activated genes. *Oncogene*, **2003**; 22: 7687-7694.
326. Matsushita M, Yamazaki R, Kawakami Y. Quantitative analysis of PRAME for detection of minimal residual disease in leukaemia. *Methods Mol Med*, **2004**;97:267-275.
327. Oberthuer A, Hero B, Spitz R, Berthold F, Fischer M. The tumour-associated antigen PRAME is universally expressed in high-risk neuroblastoma and associated with poor outcome. *Clin Cancer Res*, **2004**;10:4307-4313
328. Doolan P, Clynes M, Kennedy S, Mehta JP, Crown J, O'Driscoll L. Prevalence and prognostic and predictive relevance of PRAME in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, **2007 July 12**
329. Prabhala RH, Munshi NC. Immune Therapies. *Hematol Oncol Clin North Am*. **2007 Dec**; 21(6):1217-30, x-xi.
330. Epping MT, Wang L, Edel MJ, Carlee L, Hernandez M, Bernards R. The human tumour antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell*, **2005**;122:835-847
331. Epping MT, Bernards R. A causal role for the human tumour antigen preferentially expressed antigen of melanoma in cancer. *Cancer Res*, **2006**;66:10639-10642
332. Epping MT, Wang L, Plumb JA, Lieb M, Gronemeyer H, Brown R, Bernards R. A functional genetic screen identifies retinoic acid signaling as a target of histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2007 November 6**; 104(45):17777-17782

333. **Lee MS, Kim YJ:** Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem* **2007**;76:447-480.
334. **Tanaka N, Wang YH, Shiseki M, Takanashi M, Motoji T.** Inhibition of PRAME expression causes cell cycle arrest and apoptosis in leukemic cells. *Leuk Res.* **2011** Sep;35(9):1219-25. Epub 2011 May 7.
335. **Paydaş S.** Is everything known in all faces of iceberg in PRAME? *Leuk Res.* **2008** Sep;32(9):1356-7. Epub 2008 Apr 9.
336. **De Carvalho DD, Binato R, Pereira WO, et al.** BCR–ABL-mediated upregulation of PRAME is responsible for knocking down TRAIL in CML patients. *Oncogene* **2011**;30:223–33.
337. **Oehler VG, Guthrie KA, Cummings CL, et al.** The preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) inhibits myeloid differentiation in normal hematopoietic and leukemic progenitor cells. *Blood* **2009**;114:3299–308.
338. **Tajeddine N, Gala JL, Louis M, SchoorMV, Tombal B, Gailly P.** Tumor-associated antigen preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) induces caspase-independent cell death in vitro and reduces tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* **2005**;65:7348–55.
339. **Steinbach D, Pfaffendorf N, Wittig S, Gruhn B.** PRAME expression is not associated with down-regulation of retinoic acid signaling in primary acute myeloid leukemia, *Cancer Genetics and Cytogenetics* 177 **2007**;51-54
340. **Gollner S, Steinbach D, Schenk T, Gruhn B, Zintl F, Ramsay E.** Childhood acute myelogenous leukemia: association between PRAME, apoptosis and MDR-related gene expression. *Eur J Cancer* **2006**;42:2807-14.
341. **Costessi A, Mahrour N, Tijchon E, Stunnenberg R, Stoel MA, Jansen PW, Sela D, Martin-Brown S, Washburn MP, Florens L, Conaway JW, Conaway RC, Stunnenberg HG.** The tumour antigen PRAME is a subunit of a Cul2 ubiquitin ligase and associates with active NFY promoters. *EMBO J.* **2011** Aug 5;30(18):3786-98.
342. **Staeger MS, Banning-Eichenseer U, Weissflog G, Volkmer I, Burdach S, Richter G, Mauz-Körholz C, Föll J, Körholz D.** Gene expression profiles of Hodgkin's lymphoma cell lines with different sensitivity to cytotoxic drugs. *Exp Hematol.* **2008** Jul;36(7):886-96.
343. **Willenbrock K, Küppers R, Renne C, et al.** Common features and differences in the transcriptome of large cell anaplastic lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica.* **2006**;91:596–604.
344. **Schwering I, Bräuninger A, Distler V, Jesdinsky J, Diehl V, Hansmann ML, Rajewsky K, Küppers R.** Profiling of Hodgkin's lymphoma cell line L1236 and germinal center B cells: identification of Hodgkin's lymphoma-specific genes. *Mol Med.* **2003 Mar-Apr**; 9(3-4):85-95.
345. **Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Jose-Eneriz ES, Garate L, Cordeu L, Cervantes F, Prosper F, et al:** Epigenetic regulation of PRAME gene in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* **2007**;31:1521-1528.
346. **Steinbach D, Viehmann S, Zintl F, Gruhn B.** PRAME gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* **2002**;138: 89-91.

347. Watari K, Tojo A, Hagamura-Inone T, Nagamura F, Takeshita A, Fukushima T, Motoji T, Tani K, Asano S. Identification of a melanoma antigen, PRAME, as a BCR/ABL-inducible gene. *FEBS Lett*, **2000**; 466: 367-371
348. Radich JP, Dai H, Mao M, et al. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**;103:2794–9.
349. Van Baren N, Brasseur F, Godelaine D, Hames G, Ferrant A, Lehmann F, Andre M, Ravoet C, Doyen C, Spagnoli GC, Bakkus M, Thielemans K, Boon T. Genes encoding tumor-specific antigens are expressed in human myeloma cells? *Blood*, **1999**; 94: 1156-11
350. Proto-Siqueira R, Falco RP, de Souza CA, Jose Ismael S, Zago MA. The expression of PRAME in chronic lymphoproliferative disorders. *Leuk Res* **2003**;27:393–396.
351. Arons E, Suntum T, Marguiles I, Yuan C, Stetler-Stevenson M, Kreitman RJ. PRAME expression in hairy cell leukemia. *Leuk Res*, **2008**;32:1400-6.
352. Pellat-Deceunynck C, Mellerin MP, Labarriere N, Jegou G, Moreau-Aubry A, Harousseau JL, Jotereau F, Batallie R. The cancer germ-line genes MAGE-1, MAGE-3, and PRAME are commonly expressed by human myeloma cells. *Eur J Immunol*, **2000**; 30: 803-809.
353. Matsushita M, Yamazaki R, Ikeda H, Kawakami Y. Preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) in the development of diagnostic and therapeutic methods for hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* **2003**; 44: 439-444.
354. McElwaine S, Mulligan C, Groet J, et al. Microarray transcript profiling distinguishes the transient from the acute type of megakaryoblastic leukaemia (M7) in Down's syndrome, revealing PRAME as a specific discriminating marker. *Br J Haematol* **2004**;125:729–742.
355. Adams S.P, Sahota S.S., Mijovic A., Czepulkowski B, Padua R.A, Mufti G.J. & Guinn B.A. Frequent expression of HAGE in presentation chronic myeloid leukaemias. *Leukemia*, **2002**;16, 2238–2242.
356. Greiner, J., Ringhoffer, M., Taniguchi, M., Hauser, T., Schmitt, A., Dohner, H. & Schmitt, M. Characterization of several leukemia-associated antigens inducing humoral immune responses in acute and chronic myeloid leukemia. *International Journal of Cancer*, **2003**;106, 224–231.
357. Greiner, J., Schmitt, M., Li, L., Giannopoulos, K., Bosch, K., Schmitt, A., Dohner, K., Schlenk, R.F., Pollack, J.R., Dohner, H. & Bullinger, L. Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: implications for specific immunotherapeutic approaches. *Blood*. **2006 Dec 15**;108(13):4109-17.
358. Guinn, B.A., Bland, E.A., Lodi, U., Liggins, A.P., Tobal, K., Petters, S., Wells, J.W., Banham, A.H. & Mufti, G.J. Humoral detection of leukaemia-associated antigens in presentation acute myeloid leukaemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2005**;335, 1293–1304.
359. Jaeger U, Kainz UJ. Monitoring minimal residual disease in AML: the right time for real time. *Ann Hematol*, **2003**; 82: 139-147.
360. Tajeddini N, Millard I, Gailly P, Gala JL. Real-time RT-PCR quantification of PRAME gene expression for monitoring minimal residual disease in acute myeloblastic leukemia. *Clin Chem Lab Med*, **2006**;44:548-55.

361. **Qin Y, Zhu H, Jiang B, Li J, Lu X, Li L, Ruan G, Lin Y, Chen S, Huang X.** Expression patterns of WT1 and PRAME in acute myeloid leukemia patients and their usefulness for monitoring minimal residual disease. *Leuk Res.* **2009**;33 (5):603-4.
362. **Oberthuer A, Hero B, Spitz R, Berthold F, Fischer M.** The tumor associated antigen PRAME is universally expressed in high-evre neuroblastoma and associated with poor outcome. *Clin Cancer Res* **2004**;10:4307-13.
363. **Partheen K, Levan K, Osterberg L, Claesson I, Fallenius G, Sundfeldt K, Horvath G.** Four potential biomarkers as prognostic factors in evre III serous ovarian adenocarcinomas. *Int. J. Cancer* **2008**;123:2130-2137.
364. **Bankovic J, Stojisic S, Jovanovic D, Andjelkovic T, Milinkovic V, Ruzdijic Z, Tanic N.** Identification of genes associated with non-small-cell lung cancer promotion and progression. *Lung Cancer*, **2010**;67 (2):151-9.
365. **Figueiredo DL, Mamede RC, Proto-Siqueria R, Neder L, Silva WA jr, Zago MA.** Expression of cancer testis antigens in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck.* **2006**;28 (7):614-9.
366. **Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, PeterseHL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, KerkhovenRM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH.** Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, **2002**;415: 530-536.
367. **Epping MT, Hart AA, Glas AM, Krijgsman O, Bernards R.** PRAME expression and clinical outcome of breast cancer. *Br J Cancer*, **2008**;99 (3):398-403.
368. **Salgaller ML, Marincola FM, Cormier JN, Rosenberg SA.** Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp 10 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancncer Res*, **1996**; 56: 4749-4757.
369. **Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg S, Schadendorf D.** Vaccination of melanoma patients with peptide or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* **1998**; 4: 328-332.
370. **Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G.** Vaccination with MAGE-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* **1999**;190: 1669-1678.
371. **Marchand M, van Baren N, Weynants P, Brichard V, Dreno B, Tessier MH, Rankin E, Parmiani G, Arienti F, Humblet Y, Bourland A, Vanwijck R, Lienard D, Beauduin M, Dietrich PY, Russo V, Kerger J, Masucci G, Jager E, De Greve J, Atzpodien J, Brasseur F, Coulie PG, van der Bruggen P, Boon T.** Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer*, **1999**; 80: 219-230.
372. **Li L, Schmitt A, Reinhard P, Greiner J, Ringhoffer M, Vaida B, Bommer M, Vollmer M, Wiesneth M, Döhner H, Schmitt M.** Reconstitution of CD40 and CD80 in dendritic cells generated from blasts of patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Immunity*, **2003**; 3: 8-19.

373. **Barbara-ann Guinn, Khalid Tobal, Ken I. Mills.** Comparison of the survival implications of tumour-associated versus cancer-testis antigen expression in acute myeloid leukaemia. *Journal Compilation*, Blackwell Publishing Ltd No claim to original Belgium government works, **2006**;136, 509–513
374. **A. Spanaki, C. Perdikogianni, E. Linardakis, M. Kalmanti.** Quantitative assessment of PRAME expression in diagnosis of childhood acute leukemia. *Leukemia Research* 31 **2007**; 639–642
375. **Chambost H, Van Baren N, Brasseur F, Godelaine D, Xerri L, Landi SJ, Theate I, Plumas J, Spagnoli GC, Michel G, Coulie PG, Olive D.** Expression of gene MAGE-A4 in Reed-Sternberg cells. *Blood*. **2000 Jun 1**;95(11):3530-3.
376. **Santamaria C, Chillon MC, Garcia-Sanz R, Balanzategui A, Sarasquete ME, Alcoceba M, Ramos F, Bernal T, Queizan JA, Penarrubia MJ, et al:** The relevance of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) as a marker of disease activity and prognosis in acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* **2008**; 93:1797-1805.
377. **Santamaria CM, Chillon MC, Garcia-Sanz R, Perez C, Caballero MD, Ramos F, Garcia de Coca A, Alonso JM, Giraldo P, Bernal T, et al:** Molecular stratification model for prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia (CN-AML). *Blood* **2009**; 114:148-152
378. **Kawano R, Karube K, Kikuchi M, Takeshita M, Tamura K, Uike N, Eto T, Ohshima K, Suzumiya J:** Oncogene associated cDNA microarray analysis shows PRAME gene expression is a marker for response to anthracycline containing chemotherapy in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Exp Hematop* **2009**; 49:1-7.
379. **Tan P, Zou C, Yong B, Han J, Zhang L, Su Q, Yin J, Wang J, Huang G, Peng T, Shen J.** Expression and prognostic relevance of PRAME in primary osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun*. **2012 Mar 23**;419(4):801-8.
380. **Atanackovic, D. , Luetkens, T., Kloth, B., Fuchs, G., Cao, Y., Hildebrandt, Y., Meyer, S., Bartels, K., Reinhard, H., Lajmi, N., Hegewisch-Becker, S., Schilling, G., Platzbecker, U., Kobbe, G., Schroeder, T., Bokemeyer, C., Kröger, N.** Cancer-testis antigen expression and its epigenetic modulation in acute myeloid leukemia. *American Journal of Hematology* Volume 86, Issue 11, November **2011**, Pages 918-922
381. **Birtle Z, Goodstadt L, Ponting C:** Duplication and positive selection among hominin-specific PRAME genes. *BMC Genomics* **2005**; 6:120.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Vehbi ERÇOLAK
Doğum Tarihi ve Yeri : 02.09.1975 / Tarsus
Medeni Durumu : Evli
Adres : Hürriyet mah. 1719 sok. Selvi Paza 3 kat 3 no 6,
01150 Yenişehir /MERSİN
Telefon : 0 (532) 227 22 76
E-mail : vehbiercolak@hotmail.com
Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Görev Yeri : Niğde Edikli Sağlık Ocağı
: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi İç
Hastalıkları A.B.D.
: Pozantı 80.Yıl Devlet Hastanesi
: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji B.D.
Yabancı Dili : İngilizce