

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİFFÜZ BÜYÜK B-HÜCRELİ LENFOMARDA P16, P53
VE Kİ-67’NİN PROGNOSTİK ÖNEMİNİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL
ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Münevver BARAN

Danışman
Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ

Doktora Tezi

Eylül 2011
KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİFFÜZ BÜYÜK B-HÜCRELİ LENFOMARDA P16, P53 VE
Kİ-67’NİN PROGNOSTİK ÖNEMİNİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL
ARAŞTIRILMASI

Doktora Tezi

Hazırlayan
Münevver BARAN

Danışman
Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TSD-09-958 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Eylül 2011
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Münevver BARAN

İmza:



“Diffüz büyük B-hücreli lenfomalarda P16, P53 ve Ki-67’nin prognostik öneminin immünohistokimyasal araştırılması” adlı doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

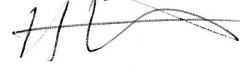
Tezi Hazırlayan

Münevver BARAN



Danışman

Prof. Dr. Hâmiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ



Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Hâmiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ



Prof. Dr. Hamiyet Dönmez-Altuntaş danışmanlığında **Münevver Baran** tarafından hazırlanan “**Diffüz büyük B-hücreli lenfomalarda P16, P53 ve Ki-67’nin prognostik öneminin immünohistokimyasal araştırılması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi-Biyoloji Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ:

Danışman : Prof.Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ

Üye : Prof.Dr. Nurhan CÜCER

Üye : Prof.Dr.Özlem CANÖZ

Üye : Yrd. Doç. İzzet YELKOVAN

Üye : Yrd. Doç. Zuhale HAMURCU

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... /...../

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince yardım ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle daima yol gösterici olan Tıbbi-Biyoloji Anabilim Dalı başkanı ve aynı zamanda danışman hocam Prof. Dr. Hamiyet Dönmez-Altuntaş'a,

Patolojik incelemeler ve değerlendirmeler esnasında değerli tecrübe ve birikimini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Özlem Canöz'e, Hematoloji Anabilim Dalı'nda Uz. Dr. Serdar Şıvgın'a ve hasta takibinde ve hasta bilgilerinde bana yardımcı olan Dr. Şule Ketenci Ertaş'a, tezimin immünohistokimyasal çalışmaları sırasında güler yüzleri, sevgi ve hoşgörüsü ile bana yol gösteren arkadaşlarım Uz. Dr. Arzu Yay ve Uz. Bio. Zeynep Ayvalı'ya ve bütün Patoloji çalışanlarına, Biyoistatistik Anabilim Dalı'dan. Yrd. Doç. Dr. Ferhan Elmalı'ya,

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki hocalarım Prof. Dr. Nurhan Cücer, Prof. Dr. Halit Canatan, Yrd. Doç. Dr. Zuhale Hamurcu'ya ve asistan arkadaşlarıma,

Eğitim hayatım boyunca en büyük yardımcılarım olan ve her konuda desteklerini esirgemeyen anneme ve babama, sevgili eşime, sabır ve anlayışları için biricik kızıma ve canım oğluma minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Münevver BARAN

Kayseri, Eylül 2011

**Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfomalarda P16, P53 ve Ki-67'nin Prognostik
Öneminin İmmünohistokimyasal Araştırılması**

Münevver BARAN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Eylül 2011

Danışman: Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ

KISA ÖZET

Diffüz büyük B-hücreli lenfoma (DBBHL) çeşitli klinik, histopatolojik, immunofenotipik ve sitogenetik özellikleri ile lenfoid neoplazmların geniş bir grubunu temsil eder. DBBHL'larda klinik parametrelerin yanı sıra, yeni tedavi ajanları, tümörün biyolojik davranışı ve prognozunu belirlemede tümör supressör gen proteinleri, onkogen proteinleri gibi gen ekspresyonları önem kazanmıştır.

Bu çalışmanın amacı, DBBHL'larda immünohistokimyasal olarak tesbit edilecek olan P16, P53, Ki-67 ekspresyonlarının hem klinik parametrelerle hem de sağkalımla ilişkisini değerlendirmektir.

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD'da 2005-2010 yılları arasında tanı almış toplam 40 DBBHL'lı hasta çalışmaya alındı. İmmunboyamalar, Ki-67, P53, P16 monoklonal antikorlar ile yapıldı ve ışık mikroskopunda değerlendirildi. Hastaların yaş ortalaması 60.50 ± 16.92 idi. Ortalama takip periyodu 16.58 ± 13.68 aydı. Hastaların yaş, cinsiyet, evre, performans durumu, B-semptomları varlığı, kemik iliği tutulumu, uluslararası prognostik indeks (IPI) skoru, laktat dehidrogenaz (LDH), ektranodal tutulum, nüks, C-reaktif protein (CRP), sedimantasyon, lökosit sayısı gibi klinik ve laboratuvar parametreleri ile genel sağkalım ve P16, P53, Ki-67 ekspresyonları arasındaki ilişki değerlendirildi. Çalışmamızda P53 ve P16 ekspresyonu, Ki-67 proliferasyon indeksi ile klinik parametreler ve sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanamadı ($p > 0.05$). Sadece P16 ekspresyonu ve evre arasında anlamlı ilişki saptandı ($p < 0.05$). Ayrıca, sağkalım süresi ile klinik parametreler arasında da istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamadı ($p > 0.05$).

Çalışmamızın sonuçlarına göre, P16 ve P53 ekspresyonunun ve Ki-67 proliferasyon indeksinin DBBHL'lı hastaların yaşam süresi üzerinde etkili olmadığını söyleyebiliriz. Ancak, DBBHL'lı hastaların prognostik öneminin daha iyi ortaya konabilmesi için daha geniş serili çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma, P16, P53, Ki-67, Prognoz.

**Immunohistochemical Investigation of P16, P53 and Ki-67's Prognostic Value in
Diffuse Large B-Cell Lymphoma**

Münevver BARAN

Erciyes University, Faculty of Medicine

Department of Medical Biology

Ph.D. Thesis, Sept 2011

Supervisor: Prof.Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ

ABSTRACT

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) represent a diverse spectrum of lymphoid neoplasms with variable clinical, histopathological, immunophenotypic and cytogenetic features. In DLBCLs, besides the clinical parameters, it has become more important gene expressions such as tumor-suppressor gene proteins, oncogen proteins in determining the prognosis, biological behaviour of the tumor and new treatment regimens. The aim of this study that P16, Ki-67, P53 expressions to be determined immunohistochemically in DLBCL was to assess relationship with both clinical parameters and survival.

A total of 40 patients with nodal DLBCL diagnosed between 2005 and 2010 in Department of Pathology Medical Faculty Erciyes University were included in the study. Immunostaining was performed by means of monoclonal antibodies Ki-67, P53, P16 and evaluated by light microscopy on slides. The median age of the patients was 60.50 ± 16.92 years old. The median follow-up period was 16.58 ± 13.68 months. It was evaluated that the relationship between clinical and laboratory parameters such as, age, gender, performance status, clinical stage, presence of B-symptoms, bone marrow involvement, International Prognostic Index (IPI) score, lactate dehydrogenase (LDH) level, extranodal extension, relapse, C-reactive protein (CRP), sedimentation, the number of leukocytes of patients and overall survival and P16, P53 Ki-67 expression. In our study, there was no statistically significant correlation between the P53 and P16 expressions, Ki-67 proliferation index both clinical parameters and overall survival ($p > 0.05$). There was only statistically significant relation in between P16 expression and stage ($p < 0.05$). Besides, there wasn't a statistical significant relation between the overall survival and clinical parameters ($p > 0.05$).

According to the results of our study, we say that the P53, P16 gene expressions, Ki-67 proliferation index no effect on life expectancy of patients with DLBCL. But, to the better counseling prognostic importance of patients with DLBCL should be done the studies of larger series.

Key words: Diffuse Large B-Cell Lymphoma, P16, P53, Ki-67, Prognosis.

İÇİNDEKİLER

Bilimsel Etiğe Uygunluk	ii
Yönergeye Uygunluk.....	iii
Kabul ve Onay	iv
Teşekkür	v
Özet	vi
Abstract	vii
İçindekiler	viii
Kısaltmalar ve Simgeler Listesi	x
Tablolar Listesi.....	xii
Şekil ve Resim Listesi	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Non-Hodgkin Lenfomalar	3
2.2. NHL’ların Sınıflandırılmasında DBBHL’ların Yeri	4
2.3. DBBHL’ların Genel Özellikleri	7
2.4. DBBHL Tanısı	7
2.5. Evreleme.....	9
2.6. Prognoz	10
2.7. Tedavi	11
2.8. İmmunfenotipik ve Genetik Özellikleri	12
2.9. Hücre Döngüsü	13
2.10.Çalışmada Kullanılan İmmunohistokimyasal Belirleyiciler	18

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
4. BULGULAR.....	27
5. TARTIŞMA	37
KAYNAKLAR	42
EKLER.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	61

KISALTMALAR

ALK	: Anaplastik lenfoma kinaz
B2M	: Beta mikroglobulin
CDK	: Siklin-bağımlı kinaz
CRP	: C-reaktif protein
DBBHL	: Diffüz büyük B-hücreli lenfoma
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ECOG	: Eastern Kooperatif Onkoloji Grubu
ESR	: Eritrosit sedimentasyon hızı
GİST	: Gastrointestinal stromal tümör
GM	: Germinal merkez
HE	: Hematoksilen-Eozin
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HPV	: Human papilloma virus
IPI	: Uluslararası prognostik indeks
LDH	: Laktat dehidrogenaz
MALT	: Mukoza ile ilişkili Lenfoid Doku
MMP	: Matriks metalloproteaz
MPF	: Olgunlaşmayı ilerleten faktör
MUM-1	: Multiple myelom onkogen-1
NGM	: Non-germinal merkez
NHL	: Non-Hodgkin's Lenfoma
NK	: Naturel killer
PBS	: Fosfat tampon solusyonu
PCNA	: Proliferatif hücre nükleer antijen
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyon
RB	: Retinoblastom

REAL	: Revise Avrupa Amerikan Lenfoma Listesi
TNF	: Tümör nekroz fakör
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. DSÖ'nün lenfoid maligniteler sınıflamasında matür B-hücreli neoplazmlar .5	5
Tablo 2.2. NHL patolojik sınıflama sistemleri içinde DBBHL'nın yeri..... 6	6
Tablo 2.3. DBBHL'ların varyantları, alt grupları ve alt tipleri 8	8
Tablo 2.4. IPI skorlamasına göre risk gruplarının sağkalım oranları 11	11
Tablo 4.1. Hastalara ait klinik parametrelerin sayısı ve yüzdesi..... 26	26
Tablo 4.2. Klinik parametrelerin ortalama ve standart sapmaları 32	32
Tablo 4.3. Klinik parametrelerle Ki-67 ve P53 ekspresyon değerlerinin korelasyon analizi sonuçları 35	35

ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

Şekil 2.1. Hücre döngüsü	14
Şekil 2.2. INK4A/ARF lokusunun yapısı ve tümör supressör yollar	16
Şekil 4.1. Sağkalım ve takip süresi	33
Şekil 4.2. Ki-67 ekspresyonu ve sağkalım	33
Şekil 4.3. P16 ekspresyonu ve sağkalım	34
Şekil 4.4. P53 ekspresyonu ve sağkalım	34
 Resim 4.1. DBBHL’larda Hematoksilen-Eozin boyaması	 30
Resim 4.2. DBBHL’larda Ki-67 pozitif boyaması.	30
Resim 4.3. DBBHL’larda P53 pozitif boyaması	31
Resim 4.4. DBBHL’larda P16 pozitif boyaması	31

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser yüksek mortalite oranı ile oldukça önemli bir sağlık sorunudur. Dünya Sağlık Örgütüne (DSÖ) göre 5 yaşından sonra kanser, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde ilk üç ölüm nedeninden biridir. Dünyada her yıl 6.4 milyon yeni kanser vakası ortaya çıkmakta ve 4.8 milyon kişi de kanser nedeni ile ölmektedir (1, 2).

Kanser her yaşta, bütün organlarda, bütün dokularda meydana gelebilir. En iyi sonucu elde edebilmek için tanı amaçlı testler ve tedavi şarttır. Tümör ve metastazlarının etkin bir şekilde tedavi edilmesinde erken tanı en önemli faktörlerden biridir (3).

Lenfomalar genel olarak klinik ve morfolojik özelliklerinden dolayı Hodgkin ve Non-Hodgkin lenfomalar (NHL) olmak üzere iki büyük gruba ayrılarak incelenirler. NHL, lenfoid sistemini oluşturan hücrelerden oluşur. Genel olarak B ve T lenfositlerden, daha az sıklıkla Naturel Killer (NK) hücrelerinden oluşmaktadır ve genellikle lenf düğümlerinden daha az sıklıkla da diğer lenfoid dokulardan kaynaklanmaktadır (4). Son yıllarda immünohistokimya ve moleküler genetiğin katkılarıyla hastalığın biyolojisi daha iyi anlaşılmış ve birçok yeni lenfoma tipi tanımlanmıştır (5).

Tüm NHL'ların %40'ını oluşturan en yaygın lenfoma tipi diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL)'lardır. Prognozda ve tedaviye cevapta heterojen klinik özellikler sergilerler. Histomorfolojik olarak DBBHL'nin anaplastik, sentroblastik, immünoblastik ve T hücre/ histiositten zengin B hücreli NHL olarak çeşitli varyantları mevcuttur (6-9). NHL'da genel olarak tedavi sonrası tedaviye yanıt oranı %60-80'dir. Ortalama 5 yıllık yaşam şansı ise %55'in üzerindedir (10, 11). Yapılan çalışmalar sonucunda son yıllarda lenfoma insidansının ve mortalitesinin arttığı rapor edilmiştir (5, 12).

Hücre proliferasyonunda ve ölümündeki dengesizlikler lenfomaların genel özelliğidir (13). Tümör süpresör genler ve onkogenlerdeki moleküler anomalilerin prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (14). DBBHL'ların biyolojik heterojenitesini tanımlamada,

klirik parametrelerin pratikte geniş olarak kullanılmasına rağmen, bu tümör supressör ve onkogen ekspresyonları faydalı indikatörler olabilirler (15-17). DBBHL'lı hastaların klinik özellikleri ve tedaviye cevaplarındaki farklılıklar, hastalığın agresifliği ve tümör progresyonunun altında yatan belirgin moleküler heterojenitesinden kaynaklanmaktadır (16, 18, 19).

Hastalığın agresifliği ve yeniden ortaya çıkma riskine karşı antikanser tedavisinin bireyselleştirilmesi için tedavi öncesi prognostik faktörlerin değerlendirilmesi çok önemlidir (20). DBBHL'larda Uluslararası Prognostik Faktör İndeks (IPI), faydalı bir klinik prognostik faktördür. Bu indeks agresif lenfomaları kategorize etmek için geliştirilmiştir ve sağkalımın bağımsız belirleyicileri olan, kolaylıkla elde edilebilen klinik göstergeler ile değerlendirilir (21).

Çalışmamızda DBBHL'larda hücre döngüsü düzenleyicilerinden olan P53, hücre siklusu progresyonunu inhibe eden P16 ve hücre proliferasyon belirleyicisi olarak kabul edilen Ki-67 ekspresyonlarının klinik parametrelerle ilişkisini ve prognoz üzerindeki etkilerini belirlemeyi amaçladık. Ayrıca C-reaktif protein (CRP), eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) ve lökosit sayısının tümör belirleyicisi olarak kullanıp kullanılmayacağını, hastalık prognozu ile ilişkili olup olmadığını da araştırmayı amaçladık. Çalışma sonuçlarımızın bu konu ile ilgili ileri çalışmalara ışık tutacağı düşüncesindeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NON-HODGKİN LENFOMALAR

İmmun sistemin habis hastalıkları, kemik iliğindeki immatür lenfoid hücrelerde veya ekstramedüller lenfoid dokudaki daha olgun lenfoid hücrelerde oluşan bazı genetik değişikliklere bağlı olarak gelişir. Ekstramedüller lenfoid dokudan gelişen lenfoid maligniteler lenfoma olarak adlandırılır. İstemsiz olarak çoğalan lenfoid hücrelerin çevre kanında ve kemik iliğinde de tespit edilmesi durumunda lösemik formdan bahsedilir. Lenfomalar genel olarak klinik ve morfolojik özellikleri ve tedavi şekilleriyle Hodgkin ve Non-Hodgkin lenfomalar (NHL) olmak üzere iki büyük gruba ayrılırlar (4).

NHL, lenfoid dokudan kaynaklanan malign bir hastalık grubu olup, etiyoloji, patogenezi, klinik davranış, hücre kökeni ve morfoloji yönünden çok heterojen özellikler sergiler (22).

Amerika Birleşik Devletlerinde yılda 55000–60000 kişi NHL tanısı almaktadır (23) ve kansere bağlı ölüm sıralamasında 6. sırada bulunmaktadır (24). Hastalar arasında yaş, cinsiyet ve ırk dağılımı değişkendir (25–27).

Lenfoproliferatif hastalıklardan NHL, Hodgkin lenfomalardan daha sık görülür (3). Lenfomanın görülme sıklığı erkeklerde daha fazladır. Yaşla birlikte insidans artmakla beraber her yaşta görülebilir. Histolojik tipler göz önüne alındığında, yaş gruplarına göre erişkinlerde düşük dereceli (grade) foliküler lenfomaların, çocuklarda ise yüksek dereceli diffüz lenfomaların daha sık olduğu görülmektedir (5). Organ transplantasyonu sonrasında yapılan immünsupresif ilaçlara bağlı olarak lenfoma riski artmıştır (28). AIDS’li hastalarda lenfoma gelişme riski normal popülasyona oranla altmış kat fazladır (29).

NHL, bağışıklık sisteminin, lenf düğümleri, kemik iliği, dalak, karaciğer ve gastrointestinal kanal gibi bölgelerindeki lenfoid hücrelerin malign, monoklonal

proliferasyonudur (3).

NHL’de genel olarak başlıca üç tip hücre bulunur. Bu hücrelerin çoğalma, olgunlaşma ve karşılaştıkları antijene spesifik olarak seçilme özellikleri mevcuttur. Her hücre tipi de, olgunlaşma sürecinin herhangi bir basamağında klonojenik olarak anormal çoğalabilir. Bu nedenle NHL’nın farklı davranış sergileyen, farklı alt tiplerinin olması hastalığın doğası gereğidir (30).

NHL’nın alt grupları arasında klinik seyir, tedaviye yanıt ve prognoz yönünden belirgin farklılıklar vardır. Prognozu etkileyen en önemli özellikler ise hastalığın kaynaklandığı hücre tipi, hücrelerin hangi farklılaşma aşamasında olduğu, başlangıç tutulum yeri ve hastalığın klinik seyridir (4).

NHL’lar içerisinde hem en yüksek oranda görülen, hem de klinik, morfolojik, imünfenotipik ve sitogenetik olarak en heterojen olan grup lenfomalar DBBHL’dır (6).

2.2. NHL’LARIN SINIFLANDIRILMASINDA DBBHL’LARIN YERİ

NHL’ları, prognoz veya hücre kökeni açısından farklı türlere ayırabilen, tedaviye yön verebilen değişik patolojik sınıflamalar yapılmıştır. NHL’nın sınıflaması pek çok kez değiştirilmiş olup, bunun nedenleri arasında immünfenotipik, histopatolojik ve genetik alanındaki gelişmeler sayılabilir. İlk olarak 1940 yılında, Gall ve Mallory lenfomaları, dev hücreli lenfosarkom ve retiküler hücreli sarkoma olarak sınıflandırdılar (31).

Daha sonra 1966’da Rappaport, lenfomaları büyüme özelliklerine, hücrelerin şekillerine ve çaplarına göre sınıflandırdılar (32). NHL’lar bu sınıflandırma ile hücrelerin mikroskobik büyüme paterni, hücre tipi ve farklılaşma derecelerine göre alt gruplara ayrılmıştır (33).

1970’li yıllarda önce Lukes-Collins sınıflanması yapılmış, bu sınıflama ile lenfomalar lenfosit alt tiplerine göre (T hücreli ve B hücreli) ikiye ayrılmıştır (34, 35).

Ardından 1974 yılında yapılan Kiel sınıflaması özellikle Avrupa’da yaygın bir kullanım alanına sahipti. Birçok lenfoma kategorisini ortaya koymada yararlı olmasıyla birlikte, özellikle nodal lenfomalar için yapılmış bir sınıflandırma şekli olmasına rağmen, ektranodal lenfomalar için çok uygun değildi (36).

1982’de hematopatologlar ve klinisyenler arasındaki iletişimi arttırmak için Working Formulation (WF) sınıflaması oluşturuldu. Bu sınıflamaya göre NHL’lar sağkalım

istatistiklerine göre düşük, orta ve yüksek dereceli olarak üç prognostik gruba ve her bir prognostik grup da kendi içinde yapısına (folliküler veya diffüz) ve hücrelerin sitolojik görünümüne göre farklı morfolojik kategorilere ayrılmıştı (37).

1994 yılına kadar Working Formulation sınıflaması geçerliliğini korumuş olup 1994 yılında Uluslararası Lenfoma Çalışma Grubu tarafından Revised European American Lymphoma Listing (REAL) yaklaşımı gündeme getirilmiştir. Bu sınıflandırma sisteminde ise her lenfoma tipinin morfolojik, klinik, immünofenotipik ve genotipik özellikleri birlikte kullanılmıştır (36).

REAL sınıflaması 2001’de ve ardından 2008’de daha da geliştirilmiş DSÖ sınıflaması olarak (World Health Organization=WHO) güncellenmiştir (6, 9) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: 2008 DSÖ’nün lenfoid maligniteler sınıflamasında matür B-hücreli neoplazmlar.

- Kronik lenfositik lösemi/küçük lenfositik lenfoma
- B-hücreli prolenfositik lösemi
- Dalagın marjinal zon lenfoması
- Hairy hücreli lösemi
- Lenfoplazmasitik lenfoma
- Ağır zincir hastalıkları
- Plazma hücreli myelom
- Kemiğin soliter plazmositomu
- Ekstraoseos plazmostom
- Ekstranodal marjinal zon B hücreli lenfoma of MALT
- Nodal marjinal zon lenfoma
- Folliküler lenfoma
- Primer kutanöz folikül merkezli lenfoma
- Mantle hücreli lenfoma
- Diffüz büyük B- hücreli lenfoma (DBBHL)

- Kronik enflamasyonla ilişkili DBBHL
- Lenfomatoid granülomatozis
- Primer mediastinal (timik) büyük B hücreli lenfoma
- İntravasküler büyük B-hücreli lenfoma
- ALK pozitif büyük B-hücreli lenfoma
- Plazmablastik lenfoma
- Primer efüzyon lenfoma
- Burkitt lenfoma
- Burkitt lenfoma ve DBBHL arasında ara özellikli sınıflandırılmayan B-hücreli lenfoma
- Hodgkin lenfoma ve DBBHL arasında ara özellikli sınıflandırılmayan B-hücreli lenfoma

DBBHL tanımlaması, 2008 DSÖ'ye kadar farklı adlarla tanımlanmıştır (Tablo 2.2) (6, 9).

Tablo 2.2: NHL'nın patolojik olarak sınıflama sistemleri içinde DBBHL'nın yeri

Rappaport	Diffüz histiositik Lenfoma
Lukes-Collins	Sentroblastik Lenfoma B-immünoblastik Lenfoma B-büyük hücreli anaplastik lenfoma
Kiel	Büyük çentikli folliküler merkez hücreli lenfoma Büyük çentiksiz folliküler merkez hücreli lenfoma B-immünoblastik lenfoma
WF	Diffüz miks-küçük ve büyük hücreli lenfoma (grup F) Diffüz büyük hücreli lenfoma (grupG) Büyük hücreli immünoblastik lenfoma
REAL, DSÖ	Diffüz büyük B-hücreli lenfoma

2.3. DBBHL'LARIN GENEL ÖZELLİKLERİ

DBBHL, yetişkin NHL'ların %30-40'ını meydana getiren, klinik, morfolojik, immunfenotipik ve genetik özellikleri ile heterojenite gösteren, yüksek dereceli bir lenfoid neoplazmdır (6, 22).

Hastalığın agresif seyrine karşın, hastaların başlangıç tedavisine yanıtı genellikle iyidir. Birçok çalışmada, uzun süreli takiplerde, hastaların %75-80'inde tam remisyon mevcutken hastalıksız hayatta kalma oranı yaklaşık %50 olarak bildirilmektedir (38, 39).

Çocuklarda ve gençlerde de görülebilmesine rağmen, sıklıkla erişkinlerde görülür (40). Ortalama görülme yaşı 70'dir ve erkeklerde kadınlara göre biraz daha fazla görülür (6).

DBBHL'nın sebebi veya sebepleri bilinmemektedir. Genellikle DBBHL, sıklıkla de-novo olarak ortaya çıkar fakat bazen küçük lenfositik lenfoma, folliküler lenfoma, marjinal zon lenfoma, nodüler lenfosit predominant hodgkin lenfomadan da DBBHL'a transformasyon olabilir (6, 41).

Hastalarda tümör genellikle hızlı büyüyen tek, nodal veya ektranodal yerleşimli kitle semptomu olarak ortaya çıkar (6, 41). DBBHL olgularının yaklaşık 1/3'ü ektranodal tutulum oluşturmaktadır (42-44). En sık ektranodal tutulum yeri gastrointestinal sistemdir (mide, ilioçekal bölge). Bunu, cilt, santral sinir sistemi, kemik, testis, yumuşak doku, tükürük bezi, genital, akciğer ve böbrek takip eder. Hastalar tipik olarak hızlı büyüyen, sıklıkla semptomatik tek bir nodal ya da ektranodal tutulum ile gelir. Evreleme tetkiklerinde ise çoğunlukla hastalığın yaygın olduğu tespit edilmiştir (6). Erişkinlerin %40'ı tedaviye iyi cevap verir ve sağ kalım süresi uzundur. Geri kalanları hastalıktan dolayı kaybedilir (45).

DBBHL'lar, diffüz büyüme özelliği gösteren ve mitoz hızı yüksek tümörlerdir (24, 46). DBBHL'da hücrelerin, nükleer boyutları, normal makrofaj ile aynı ya da daha büyük veya normal bir lenfosit boyutunun 2 katından daha fazladır. Pleomorfizm ve çok sayıda mitoz izlenir (6, 22). Hücrelerin morfolojik olarak ortak özellikleri diffüz büyüme modelindedir. DBBHL'da çoğalan hücreler genel olarak çekirdek zarına doğru kromatin dağılımına bağlı olarak veziküler görünümü olan oval veya yuvarlak çekirdekli hücrelerdir. Nükleolus belirgindir ve bazen 2-3 tane olabilir. Sitoplazma genelde artmış ve soluk bazofilik görünümde olabilir (47). 2008 DSÖ sınıflamasında DBBHL'ların varyantları, alt grupları ve alt tipleri Tablo 2.3'de verilmiştir (9).

Tablo 2.3: DBBHL'nin varyantları, alt grupları ve alt tipleri.

- **Yaygın morfolojik varyantlar**
 - Sentroblastik varyant
 - İmmunoblastik varyant
 - Anablastik varyant
- **Nadir morfolojik varyantlar**
- **Moleküler alt gruplar**
 - Germinal merkez benzeri B-hücreli (GCB)
 - Aktive olmuş B-hücreli (ABC)
- **İmmünohistokimyasal alt gruplar**
 - CD 5 pozitif DBBHL
 - Germinal merkez benzeri B-hücreli (GCB)
 - Non germinal merkez benzeri B-hücreli (NGCB)
- **Diffüz büyük B hücreli lenfoma alt tipleri**
 - T-hücre/histiyositce zengin büyük B-hücreli lenfoma
 - Merkezi sinir sisteminin primer DBBHL
 - Primer kütanöz DBBHL
 - EBV pozitif DBBHL

Morfolojik olarak DBBHL, büyük transforme olmuş lenfoid hücrelerden oluşur, fakat sitolojik olarak birbirinden son derece farklı görünümler oluşturur. Bu morfolojik farklılıklar nedeniyle DBBHL'ların yaygın morfolojik varyantları: sentroblastik varyant, immünoblastik varyant, anaplastik varyant olmak üzere 3 alt gruba ayrılır (9, 48-50).

2.3.1. Sentroblastik varyant: DBBHL'nin en çok görülen varyantıdır. Bu varyantı oluşturan hücreler histomorfolojik olarak reaktif lenf nodunun germinal merkezlerinde çoğalan sentroblastlara (büyük çentiksiz hücelere) benzerler. Hücreler 10-14 µm çapta olup, yuvarlak-oval veziküler nükleuslu, ince kromatinli, 2-4 adet membrana bağlı nükleolus içerirler. Sitoplazmaları dar ve bazofiliktir (51, 52). Sentroblastik varyant DBBHL'da immünoblast benzeri hücrelerde izlenebilir. Bu hücrelerin oranı son derece değişkendir (51).

2.3.2. İmmünoblastik varyant: Bu varyant tümörü oluşturan hücrelerin %90'ından fazlası immünoblastik varyantı oluşturmaktadır. Bu hücreler veziküler nükleus,

santralde lokalize tek nükleolus ve kalın nükleer membranları olan bazofilik sitoplazmalı hücrelerdir (42-44, 49, 50). Sentroblastik varyantla karşılaştırıldığında olguların sağkalım sürelerinin çok daha kısa olduğunu iddia eden bazı araştırmacılara göre immünoblastik varyantın prognozu daha kötü olup daha agresif gidiş göstermektedir (43, 53, 54).

2.3.3. Anaplastik varyant: Bu varyant çok büyük yuvarlak, oval yada pleomorfik ve Reed-Stenberg hücrelerine benzeyen neoplastik hücrelerden oluşur. Anaplastik varyantlar, DBBHL'ların küçük bir yüzdesini oluşturduğu için henüz yeteri kadar araştırılmamıştır (55).

2.4. DBBHL TANISI

NHL'da, biyopsi dışında tanı koydurucu nitelikte bir laboratuvar bilgisi yoktur. Lenfoma tanısını doğrulamak için uygun doku biyopsisinin histolojik incelemesi gereklidir ki bu etkilenmiş bir lenf nodunun eksizyonel biyopsisi ile yapılır. Ekstranodal yerleşimli ise tutulmuş bölgeden uygun şekilde biyopsi alarak tanı konur. Histolojik olarak tanı konmuş hastalarda evrelemek için, kemik iliği biyopsisi yapılması gereklidir (56).

2.5. EVRELEME

Tedavi yöntemi seçiminde klinik evreleme önemlidir. Evre ilerledikçe hastalığın prognoz kötüleşmektedir. Günümüzde prognozu belirlemek için önemli faktörlerden biri evrelemede kriter olarak, tutulan lenf nodülleri sayısı, tutulan bölgenin diyaframın aynı ya da farklı taraflarında olması, ekstranodal organ tutulumunun olup olmaması gibi parametreler bulunmaktadır. Evreleme sisteminde olguların ateş, terleme, vücut ağırlığının %10'undan fazla kilo kaybı gibi semptomlar ayrıca belirtilmelidir (57). Bu amaçlar için kullanılan ilk sınıflandırma sistemi Ann Arbor evreleme sistemidir (58).

2.5.1: Ann Arbor evreleme Sistemi

Evre I: Tek lenf nodu bölgesi tutulumu

Evre I E: Tek bir ekstranodal organ ya da bölge tutulumu

Evre II: Diyaframın aynı tarafında iki ya da daha fazla lenf nodu bölgesi tutulumu

Evre II E: Lokalize ekstranodal organ ya da bölge tutulumu ve buna eşlik eden bir veya daha fazla lenf nodu bölgesi tutulumu

Evre III: Diyaframın her iki tarafında lenf nodu tutulumu

Evre III E: Lokalize ektranodal organ ya da bölge tutulumu

Evre III S: Dalak tutulumu (ektranodal organ veya bölge tutulumu birlikte olursa evre IIISE)

Evre IV: Yaygın ektranodal organ veya bölge tutulumu

A: Sistemik semptom yok

B: Ateş>38 derece, gece terlemesi, kilo kaybı var.

Bu sistemde tümör kitlesinin büyüklüğü dikkate alınmamıştır. Tümör kitlesinin büyüklüğü kötü prognoz yönünden önemli bir kriterdir. Günümüzde ise bu eksikliği gidermek için Costwolds olarak adlandırılan bir sınıflama sistemi kullanılmaktadır (5).

Performans durumu hastanın genel durumu ile ilgili bir ölçüttür. Performans değerlendirmesinde Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) kriterleri aşağıdaki gibi numaralandırılır.

0: Tam aktif

1: Ağır iş yapamaz, ancak günlük işlerini yapabilir, ev ve ofis işlerini yapabilir.

2: Günlük işlerini yapabilir ama ev ve ofis işlerini yapamaz, uyanık zamanının %50'den fazlasını yatak dışında geçirir.

3: Günlük ihtiyaçlarının ancak sınırlı bir bölümünü yapabilir, uyanık zamanının %50'den fazlasını yatakda geçirir.

4: Yardımsız hiçbir iş yapamaz, tamamen yatağa veya sandalyeye bağımlıdır (59).

2.6. PROGNOZ

Histopatoloji, hastalığın evresi ve yüzey marker incelemelerinin sonuçları hastalığın prognozunu ve tedaviye yanıtı önemli derecede etkiler (3). DBBHL'ların prognozunu belirlemek için IPI skorlaması kullanılmaktadır. DBBHL'larda oldukça yararlı olan bu skorlama sistemi agresif lenfomaları kategorize etmek için geliştirilmiştir ve sağkalımın bağımsız belirleyicileri olan, kolaylıkla elde edilebilen klinik göstergeler ile değerlendirilir. Başlıca beş parametre üzerine kurulmuştur. Her bir parametreye bir puan verilmiştir:

1. Yaş >60
2. Performans skoru (ECOG) ≥ 2
3. Yüksek LDH değeri (460 ve üzeri)
4. Ekstra-nodal tutulum sayısı ≥ 2
5. Ann Arbor evre III-IV

Hastalar prognostik faktörlerin sayısına uygun olarak 4 risk grubuna ayrılır (Tablo 2.4) (21).

Tablo 2.4: IPI skorlamasına göre risk gruplarının sağkalım oranları

IPI	5 yıllık sağkalım
Düşük risk (0-1)	%73
Düşük-orta derecede risk (2)	%51
Orta-yüksek risk (3)	%43
Orta-yüksek risk (3)	%26

IPI, tedaviyi belirlemede Ann Arbor evreleme sisteminden daha faydalı olmaktadır (12). Yukarıdaki beş parametreye ilaveten hastalığın histolojik tipinin agresif olması, kemik iliği tutulumu, $\beta 2M$ düzeyinin yüksek olması, B-semptomlarının bulunması, büyük tümör kitlelerinin varlığı (10 cm'den büyük) ve Ki-67 antijen pozitifliği hastalığın kötü prognoz kriterleridir (5, 60, 61).

C-Reaktif Protein (CRP); enflamatuvar hasara konakçının en temel ve en hızlı verdiği akut faz yanıtıdır. Eflamasyon, enfeksiyon, malignite ve otoimmün hastalıklar gibi birçok durum CRP düzeylerinde artışa yol açar. Otoimmün hastalıklar ve malignitelerdeki CRP artışı uzun süreli olabilir (62).

2.7. TEDAVİ

Hastanın fizyolojik durumu, histolojik tipi, klinik evre ve prognozda etkili olan faktörler göz önüne alınarak tedavi yapılır. Tedavi seçenekleri kemoterapi ve radyoterapidir (63). Düşük derece riskli lenfomalarda hastalar nadir olarak lokalize hastalıkla

başvurduğunda, bölgesel radyoterapi uzun süreli kontrol sağlar. Ancak radyoterapiden 10 yıl sonra dahi nüks görülebilir. Orta derece riskli hastaların yaklaşık yarısı lokalize hastalıkla başvurur ki, bu hastalara kombinasyon kemoterapisi ve bölgesel radyoterapi uygulanmalıdır (64, 65). Yüksek riskli hastalar, ya kök hücre destekli yüksek dozlu kemoterapi ile (66) ya da başlangıç kemoterapisine tam cevaptan sonra hemapoetik kök hücre destekli yüksek doz tedavisinden fayda görebilirler. Fakat hastaların çoğunda hastalık ilaca direnç gösterdiği için tedavi edilemeyebilir (67).

Yaklaşık 25 yıl boyunca DBBHL'nin tedavisinde CHOP (siklofosfamid, adriyamisin, vinkristin, prednizolon) rejimi kullanılmıştır (68). Bu hastalara CHOP-R ilaç kombinasyonu standarttır. Tam yanıt verenlerin yaklaşık % 70'inde kür sağlanır (56).

2.8. İMMUNOFENOTİPİK VE GENETİK ÖZELLİKLERİ

DBBHL hücreleri, tipik olarak CD19, CD20, CD22, CD79a, PAX-5 gibi pan-B yüzey antijenlerini ve sıklıkla yüzey immunglobulinleri eksprese ederler (48).

Son yıllara kadar, biyolojik heterojenite analizleri genler tedaviye yanıt, diğer maligniteler ve normal lenfosit gelişimi ile ilgili genler üzerinde yoğunlaşmıştır (69). Mikroarray yöntemi, lenfoma biyolojisine yönelik çalışmalarda güçlü ve heyecan verici yeni araçlar sağlamaktadır. DNA ya da oligonükleotid mikroarrayler kullanılarak genlerin aktivitesi ve moleküler yollar değerlendirilebilmektedir. Bu da hastalığın patolojisinde kritik roller oynayabilen moleküler yolların ve genlerin tanımlanmasını, DBBHL'nin heterojenitesinin çalışılmasını, biyolojik karakteristik özelliklerine dayalı yeni sınıflandırma sistemlerinin geliştirilmesini sağlamaktadır (70-73).

Gen ekspresyon profili çalışmaları DBBHL'yı gen ekspresyonundaki benzerliklere göre alt gruplara ayırmıştır. Fakat teknolojik olarak pahalı ve zahmetli olan bu yöntem yerine daha basit, ucuz ve geniş uygulama alanına sahip olan immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak DBBHL'ların germinal merkez (GMK) ve non-germinal merkez (NGMK) olarak alttiplere ayrılabilceği anlaşılmıştır. Buna göre CD10 ve/veya bcl-6 (+), MUM-1 (-) (multiple myelom onkogen-1) olgular GMK kabul edilirken, MUM-1 (+) olgular NGMK olarak kabul edilmektedir (74).

DBBHL'de sıkça karşılaşılan çeşitli genetik anomaliler;

1. Kromozomal translokasyonlar ya da gen amplifikasyonu yolu ile

protoonkogenlerin aktivasyonu

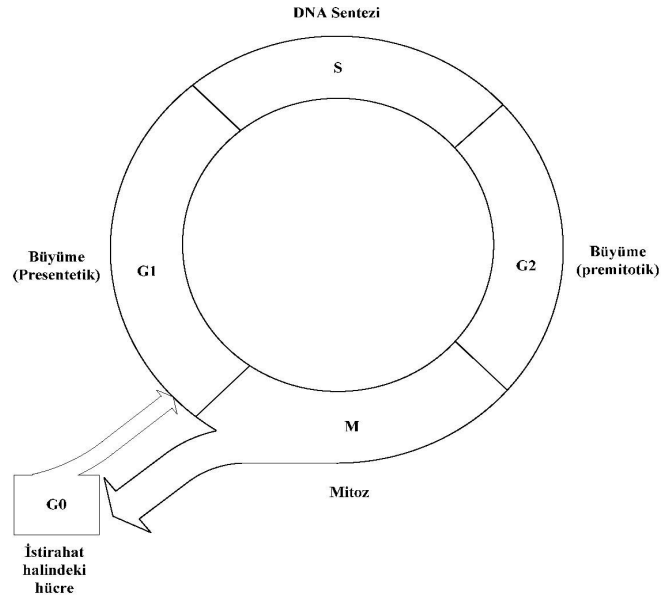
2. Delesyon, mutasyon ya da promotor hipermetilasyonu yolu ile tümör supresör genlerin inaktivasyonu
3. Onkogenik virüslerle enfeksiyondur (75).

Bu anomalilerin hastalığın gelişimi ve prognozu üzerine çeşitli düzeylerde etkisi olduğu belirtilmektedir. DBBHL'da prognozu etkileyebilen çeşitli kromozomal dengesizlikler mevcuttur. En sık karşılaşılan anormallikler Bcl-6, Bcl-2 ve c-myc gen ekspresyonlarıdır (48, 76).

DBBHL'da sıklıkla immünglobülin ağır ve hafif zincir genlerinde yeniden düzenlenmeler ve değişik bölgelerde somatik hipermutasyonlar bulunmuştur (77). Vakaların %45'inde görülen somatik hipermutasyonlar antikor çeşitliliğine neden olmakta, antijene eğilimi arttırmakta ve aynı zamanda kromozomal translokasyonların oluşumu için zemin oluşturmaktadır (78). DBBHL'lı vakaların %50'sinde kromozomal translokasyonlar görülür (48).

2.9. HÜCRE DÖNGÜSÜ

Hücre döngüsü, hücre büyümesi ve bölünmesi olarak geçer. Mitoz ve interfaz olmak üzere iki bölümden oluşur. Hücre döngüsünün en önemli evresi olan mitoz, kromozomların ikiye bölünmesi, ardından hücre bölünmesi ile sonlanır. Bu evre yarım saat sürer. Mitozlar arasındaki evre olan interfaz, hücre döngüsünün %95'ini oluşturur. İnterfaz sırasında kromozomlar dekondanse olarak nükleusa dağılırlar. Moleküler düzeyde interfaz, hücre büyümesi ve replikasyonunun olduğu zaman dilimidir. Ökaryotik hücre döngüsü dört fazdan oluşur (Şekil 2.1) (79).



Şekil 2.1: Hücre döngüsü (79).

M fazı: Mitoza karşılık gelir ve bunu hücre bölünmesi izler. Mitoz geleneksel olarak dört evreye ayrılır. Profaz, metafaz, anafaz ve telofazdan oluşur. Mitoz fazının ilk evresi olan profaz kondanse kromozomların görülmesi ile başlar ve nükleer zarfın parçalanması ile sona erer. Prometafaz mitoz iplikcikleri, kromozomları metafaz hattında dizilinceye kadar çeker. Hücrelerin çoğu anafaza girmeden önce metafazda sadece kısa bir süre için kalırlar. Anafazda kromatidler arasındaki bağlantı kopar ve kardeş kromatidler ayrılarak karşı kutuplara göç eder. Mitoz, nükleusların yeniden oluştuğu ve kromozomların yoğunluğunun kaybolduğu, telofaz ile sonlanır.

G1 fazı: Mitoz ile Deoksiribonükleik asit (DNA) replikasyonu arasında kalan, hücrenin metabolik olarak aktif olduğu ve sadece hücre büyümesinin gerçekleştiği evredir. DNA sentezi için gerekli proteinler sentezlenir.

S fazı: DNA replikasyonunun gerçekleştiği evredir.

G2 fazı: Hücrenin büyümeye devam ettiği ve mitoz hazırlık için protein sentezinin olduğu evredir.

Hücre döngüsünün önemli kontrol noktalarından biri G1'in geç döneminde olup büyüme faktör varlığı ile ilgilidir. G1, G2 ve S fazında hasarlanmış DNA'ya, G2 fazında replike olmamış DNA'ya, mitozun sonuna doğru ise yanlış kromozom dizilişine duyarlı kontrol noktaları vardır. S fazı hücre döngüsünün geri dönüşü olmayan noktasıdır. Hücre replikasyona girmeden önce G1/S kontrol noktasında DNA hasarı için kontrol edilir. Eğer DNA hasarı varsa DNA tamir mekanizmaları çalışır ve döngü durur.

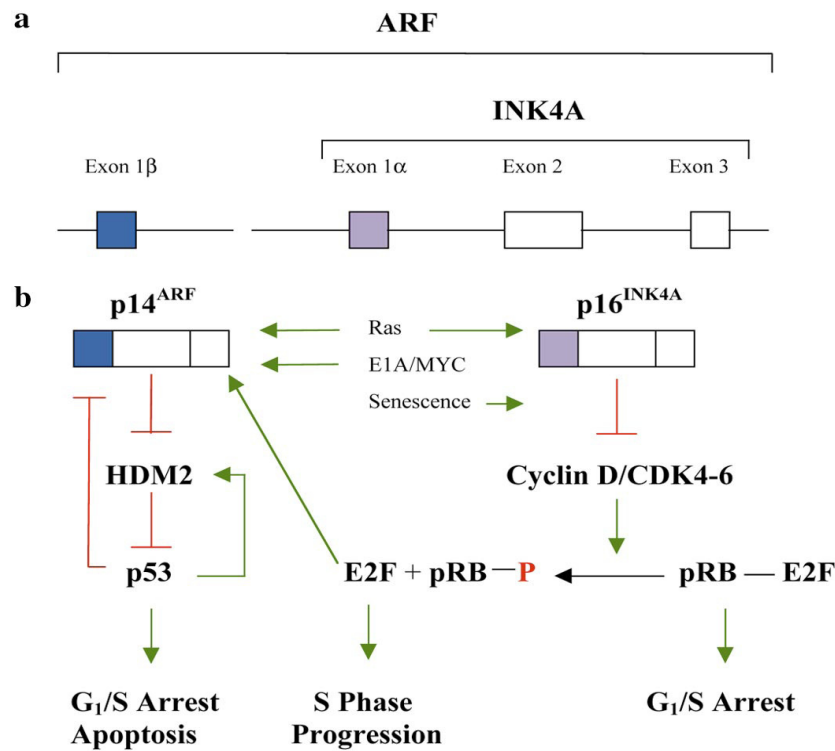
P53 gibi proteinlerin hücre içi düzeyi artarak, hücrenin S fazına geçmesi engellenir. G1 fazındaki bu düzenleme noktası ‘restriksiyon noktası’ olarak adlandırılır ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenir (80, 81).

Hücre döngüsü G1 fazı boyunca siklin D, Siklin-Bağımlı kinaz 4’e (CDK4) bağlanır ve aktive olarak siklin D-CDK4 kompleksi oluşur. Bu kompleks, retinoblastom (RB) yatkınlık proteininin fosforilasyonunda önemli role sahiptir. RB’nin fosforilasyonu hücre siklusunda moleküler değişimi sağlar. Hipofosforile olduğu durumda, RB, hücre çoğalmasını baskılar. E2F transkripsiyon faktörü ile inaktif kompleks halindedir. RB’nin fosforilasyonu bu kompleks çözülür. E2F transkripsiyon aktivitesinin inhibisyonu ortadan kalkar. Böylece RB fosforilasyonu hücre siklusunun ilerlemesinin ana engelini durdurur ve hücre çoğalmasını destekler (82). Hücre döngüsü uygun büyüme faktörlerin varlığında G1 kontrol noktasını geçer ve S fazına girer. Büyüme faktörlerinin yokluğunda ise hücre döngüsü durur ve G0 fazına girer. ‘Olgunlaşmayı ilerleten faktör (MPF)’ olarak adlandırılan ve hücre döngüsünün G2 fazından M fazına geçişini kontrol eden bir sitoplazmik faktör varlığı saptanmıştır. Bu faktör yapı olarak, siklin B ve CDK protein kinazdan oluşan bir dimerdir. Siklin B bir regülatör olup, CDK2 protein kinazın katalitik aktivitesi için gereklidir. MPF aktivitesi hücre döngüsünün devamı sırasında siklin B’in periyodik olarak birikmesi ve yıkılması ile kontrol edilir. S fazında sentezi başlayan siklin B, döngünün S ve G2 fazı boyunca CDK2 ile kompleks oluşturur. Siklin B’nin proteolitik olarak yıkımı CDK2’yi inaktive eder ve döngü interfaza geçer. G2’den mitozaya geçiş aşaması, G1 siklin olarak adlandırılan siklin grupları ile ilişkilidir. Hücre döngüsü, sadece siklinler değil aynı zamanda CDK2 ile ilişkili protein kinazlar tarafından da kontrol edilir. CDK ailesinin spesifik siklinleri hücre döngüsünün değişik aşamalarında etki göstermektedir. siklin E; G1’den S fazına geçiş, Siklin A; S fazının ilerlemesi, siklin B; G2’den M’a geçiş için, ayrıca siklin B’nin yıkımında M’dan çıkış için gereklidir (80, 81).

2.9.1 Hücre Döngüsü İnhibitörleri

CDK/siklin aktivitesi inhibitör proteinlerle de düzenlenmektedir. Bunlardan P21/P27 ailesi tüm CDK/siklin komplekslerini inhibe eder. P27, mitojenik büyüme faktörleri tarafından baskılanırken, tümör nekroz faktör (TNF) gibi antiproliferatif sinyal varlığı veya DNA hasarında indüklenir. P21’in transkripsiyonel aktivasyonu, insan kanserlerinde mutasyonu çok görülen tümör supresör gen P53’ün kontrolü altındadır. P53’ün hücre döngüsündeki esas rolü, hasarlı hücrelerin kontrol noktalarında ilerlemeyi

yavaşlatmak ya da durdurmak ve DNA tamiri gerçekleşmediği takdirde apoptoza neden olmaktadır. P21 düzeyi terminal diferansiyasyona uğramış hücreler ve G0 fazındaki hücrelerde yüksektir. P21 proteini çoğalan hücre nükleer antijen'inin (PCNA) DNA polimeraz-gama üzerinden gerçekleşen replikatif etkisini inhibe eder, fakat DNA tamir edici aktivitesine engel olamaz. Böylece hücre döngüsü durduğu halde, hasarlı DNA'nın tamiri mümkün olur. CDK inhibitörlerinden INK4 ailesi üyelerinden insan INK4a/ARF lokusu, P16INK4a ve P14ARF olmak üzere iki proteini kodlar (Şekil 2.2). Bunlar tümör supresör gen olarak adlandırılırlar ve hücre döngüsünü bloke ederler. P16INK4a, CDK4'e bağlanmak için siklin-D ile yarışır ve siklin-D/CDK4 kompleksinin inhibisyonunu sağlayarak RB'nin fosforilasyonunu engeller. Bu da hücre döngüsünü geç G1 fazında durdurur (83). P14ARF ise p53'ün feedback döngüsünü inhibe ederek p53'ü azalmaktan korur (82).



Şekil 2.2: INK4A/ARF lokusunun yapısı ve tümör supressör yollar.

a) INK4A/ARF lokusunun yapısı. Mor renk P16, mavi renk P14 transkripti.

b) INK4A/ARF lokusunda tümör supresör yollar. Bu tek gen lokusunda hem P53 hem de RB tümör supressör yolları bir noktada birleşir. Eş zamanlı etkileşimler yeşil renkle, inhibitörler ise kırmızı renkle gösterilmiştir. İki yol arasındaki karşılıklı etkileşim P16'nın E2F'ye bağlı transkripsiyonunun bir sonucu olarak meydana gelir. P14 çeşitli onkogenik streslere cevap verirken, P16 sadece Ras'a cevap verir (84).

2.9.2. Karsinogenez

Karsinogenez olayının temelinde hücre için öldürücü olmayıp mutasyona neden olan genetik hasar yatar. Genetik hasar; büyümeyi uyaran protoonkogenler, büyümeyi inhibe eden tümör supressör genler, apoptozu düzenleyen genler ve DNA onarımını düzenleyen genleri hedef alır. Protoonkogenler normal hücre genleridir; çoğalma, farklılaşma ve hücre ölümü gibi önemli işlevlerden sorumludurlar. Onkogenler ise protoonkogenlerin değişikliğe uğramış şeklidir ve onkoprotein adı verilen proteinleri kodlamaktadırlar. Bu proteinlerin aşırı artması sonucu onkogen tipine göre kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalması, hücrenin farklılaşması engellenmekte ya da apoptoz mekanizması değişmektedir. Tümör baskılayıcı genler ise hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini baskılayıcı yönde hareket ederler. Pekçok tümör bu genlerde oluşan hasar, farklılaşma nedeniyle genin işlevini yitirmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır (79, 85-87).

Malign bir neoplazm; aşırı büyüme, lokal yayılma ve uzak metastaz yapma yeteneği gibi çeşitli fenotipik özellikleri içermektedir. Bu özellikler aşamalı bir şekilde kazanılmakta ve tümör gelişimi denenen süreci oluşturmaktadır. Moleküler düzeyde genetik hasarlar, hücre fizyolojisinin malign fenotipine dönüşmesindeki altı temel değişiklik ile oluşur.

1. Büyüme sinyalinde kendi kendine yeterlilik
2. Büyümeyi inhibe eden uyarılara duyarsızlık
3. Apoptozdan kaçınma
4. Sınırsız çoğalma potansiyeli
5. Anjiyogenezin artması ve devamlılığı
6. Doku invazyonu ve metastaz yeteneği

Kanser hücreleri bu altı özelliği de kazanmakta ancak bu süreç değişik yollarla ve sırayla oluşmaktadır. Bazı tümörlerde tek bir mutasyon birçok özelliğin kendiliğinden gelişmesini sağlayarak tam gelişim için gerekli basamakları aza indirmektedir (79).

2.9.3. Apoptoz

Apoptoz (programlı hücre ölümü), yenilenen dokularda hücre çoğalması ile hücre sayısının devamı arasındaki dengeden sorumludur. Apoptozun nekrozdan farkı, sitoplazmik büzülme, kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonudur.

Sitoplazma membranı bütünlüğünü devam ettirir (88). İleri derecede kondanase olan kromatin birkaç nükleozomluk parçalar halinde nükleer zarf çevresine toplanır. Plazma membranında özel bombeleşme, bazıları kromatin içeren apoptotik cisimlerin oluşumunu sağlar (89). Apoptotik hücre kendisini tanıyan makrofajın içerisine alınır, sindirilir ve hücre atıkları çevreye yayılmadan ortadan kaldırılır. Böylece herhangi bir doku hasarı olmaksızın işlevsiz hücrenin yok edilmesi sağlanır (90).

2.9.4 Anjiyogenez

Bir tümörün damarlanma olmadığı sürece birkaç milimetreden daha fazla büyümesi olanaksızdır (79, 91). Karsinogenez açısından çoğalan neoplazik hücrelerin ihtiyacı olan oksijen ve besinlerin sağlanması ancak anjiyogeneze olmaktadır. Bunun yanında metastaz, tümör büyümesi ve ilerlemesi gibi olaylar anjiyogeneze bağlıdır (79).

2.9.5 İnvazyon ve Metastaz

Karsinogenezde bir diğer önemli konu da neoplazik hücrelerin lokal olarak invazyon yeteneği ve uzak mesafelere ulaşma, metastaz yapabilmeleridir. Matriks dejenerasyonu ve hücre hareketi bu süreçte önem kazanmaktadır. Matriks metalloproteazları (MMP) matriks dejenerasyon enzimleri bazal membran tabakasının kollajen yapısının yıkılmasında görev alır. MMP ekspresyon artışı neoplazik hücrelerin invazyonunu ve metastazını göstermektedir (79, 92, 93).

2.10. ÇALIŞMADA KULLANILAN İMMUNOHİSTOKİMYASAL BELİRLEYİCİLER

2.10.1. P53

P53, 17. kromozomun kısa kolunun 13.1 bölgesinde lokalize, 11 eksona sahip tümör supresör gendir. 397 aminoasitlik bir proteini kodlar (94, 95). P53 hücre döngüsünün düzenlenmesi ve apoptozda önemli rol oynar. Genetik olarak hasara uğramış hücrelerin çoğalmasını engeller. P53 geni hücre döngüsünde hücre proliferasyonu, G1'den S fazına geçişi düzenleyerek etki eden nükleer fosfoproteindir (96). Hücre döngüsünün durdurulması için P53 proteini, P21 geninin transkripsiyonunu stimüle eder (97, 98).

Bir hücre mutajen bir etkenle karşılaştığında, P53 stabilize olup hücre nükleusunda toplanır. Hücrede birikmiş olan doğal tip P53 DNA'ya bağlanır ve hücrenin, hücre döngüsünün G1 fazında durdurulmasına neden olur. Bu geriye dönüşümlü duraklama

hücre açısından olumlu olup, DNA'daki hasar tamir edilmektedir. Eğer tamir mekanizması çalışmazsa, doğal tip P53 mutasyona uğrayan hücrelerin bölünme riskine karşılık apoptozu devreye sokarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı P53 geni 'genomun gardiyanı' olarak işlev yapar (99, 100).

P53 geni fiziksel faktörler (radyasyon, UV ışını, X-ray gibi), kimyasal karsinojenler, tümör virüslerinin hedefidir ve gende mutasyonlara neden olurlar. P53 geni inaktif olduğunda hücre transformasyonuna ve tümör gelişimine neden olmaktadır. Normal koşullarda doğal P53'ün yarılanma ömrü (6-30 dk.) çok kısa olduğu için dokularda ve sıvılarda tespiti zordur. Mutasyona uğramış P53 geni, yarı ömrü (6-8 saat) uzun olan bir protein salgılar. Bu nedenle tümöral dokularda immunohistokimyasal yöntemle gösterilen P53 proteini, mutant P53 proteinine aittir. Mutant P53'ün %90'dan fazlası immunohistokimyasal olarak gösterilebilir. Mutant P53'ün aşırı ekspresyonunun tanıda yeri olabilir, çünkü P53 mutasyonları normal dokuda görülmemektedir (96, 97, 101).

P53 tümör supressör geni insan kanserlerinde en sık mutasyon gösteren gendir (102). Kolon karsinomu, meme karsinomu ve akciğer karsinomlarında ayrıca mesane, karaciğer, özofagus, mide, deri, yumuşak doku tümörleri, lenfoma ve lösemilerde P53 mutasyonu sık görülmektedir (103).

2.10.2. P16

P16, 9. kromozomda lokalize olan CDK4/6'yı inaktive eden tümör supresör gendir (104, 105). Hücre döngüsünün kontrol mekanizmasında çok etkili proteinler yer alır. Özellikle G1 progresyonunun kontrolünde etkili proteinlerde meydana gelen değişiklikler, pek çok kanserin gelişimine neden olur. Bu proteinlerin en önemlileri G1 siklin bağımlı kinaz aktivitesini kontrol eden P16 ve normalde G1 siklin bağımlı kinazlar tarafından düzenlenen RB'dir (104, 106).

P16, siklin-D/CDK 4/6 kompleksine bağlanarak hücre döngüsünü G1-S interfazında RB aracılı kontrol eder (104, 107-109). RB proteini, insan papilloma virusu (HPV) E7 proteini ile fonksiyonel olarak inaktive olur. Bunun sonucunda P16 proteini birikir. Çünkü normalde RB, P16 transkripsiyonunu inhibe eder. P16 ve RB ekspresyonu arasında karşılıklı ilişki vardır. P16 seviyesi ve RB, negatif feedback ile kontrol edilir. P16 geni pek çok kanserde, mutasyon, delesyon ve promotorun hipermetilasyonu ile inaktifleşir (104, 109).

Normalde displazi içermeyen hücrelerde P16 proteini oldukça düşük seviyededir ve immunohistokimyasal olarak tespit edilemez (110). Yetişkinlerde normal proliferatif endometriumda, meme duktal epitelinde, serviksin tubal metaplazik epitelinde, özofageal skuamöz epitelde ve tükürük bezinde ekspresyonu vardır. Ayrıca pankreasın Langerhans hücreleri, testisin Leyding ve sertoli hücrelerinde de eksprese edilebilir (105, 111).

P16 displastik servikal hücrelerde güçlü overekspresyon gösterir ve immunohistokimyasal olarak kolayca gösterilebilir. Bu yüzden P16, displastik servikal hücrelerde, yüksek riskli HPV tiplerinin onkogen ekspresyonunu göstermek için kullanışlı bir belirleyicidir (110).

2.10.3. Ki-67

Ki-67, 345 ve 395 kd ağırlığındaki iki molekülden oluşur ve geni 10. kromozom üzerinde bulunan non-histon bir proteindir. İnsan genomunda 30.000 baz çifti tarafından kodlanır (112). Ki-67, solid tümörler ve bazı hematolojik malignitelerde hücre çoğalma belirleyicisi olarak kullanılır. Malign hücrelerde kontrolsüz hücre çoğalması olduğundan, Ki-67 indeksi oldukça yüksektir (113).

Ki-67 antikoru sadece normal hücrelerin ve çoğalan hücrelerin nükleuslarında reaktiftir. Ki-67'nin yarılanma ömrü yarım saatir. Çünkü Ki-67 antijeni G1, S, G2 ve mitoz fazındaki hücrelerin nükleuslarında bulunurken, dinlenme fazındaki (G0) hücrelerde eksprese edilmez. Bu yüzden hücre döngüsünden çıktıktan bir süre sonra Ki-67 saptanabilir. Ancak hücre G1 fazında uzun süre kalırsa Ki-67 seviyesi azalır ve hatta saptanmayabilir (114-116).

Hücre nükleusunda lokalize ve kompleks yapıdaki bu molekülün işlevi tam olarak bilinmemektedir. DNA ve RNA ile karmaşık etkileşiminden dolayı hücre çoğalması sırasında kritik rol oynadığı düşünülmektedir. Ki-67 immunohistokimyasal olarak lenfoid organlarda germinal merkez hücreleri gibi non-neoplastik hücrelerin dağılımını, bir başka deyişle lenfoid folikülerin normal yapısını göstermede, burkitt lenfoma, gibi bazı NHL'ların yüksek derecesini saptamada ve düşük dereceli bir lenfomanın yüksek dereceli bir lenfomaya transformasyonunu belirlemede yardımcı bir tanısal araç kullanılmaktadır (112).

Meme, akciğer, özofagus, böbrek, prostat kanseri, malign melanom ve non-Hodgkin lenfoma gibi tümörlerde yüksek Ki-67 oranı kötü prognostik faktör olarak gösterilmiştir (117).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

Demirbaş Malzemeler

- Mikrotom (Thermo Shandon)
- Su banyosu (Barnstead Electrothermal)
- Etüv (EN 500)
- Mikrodalga Fırın (Vestel)
- Nemli Chamber (BioGen)
- Otomatik mikropipet (Dragon Med)
- Doku sınırlayıcı kalem (Immumotech)
- Metal taşıma sepeti

Sarf Malzemeler

- P16 antikor (CINtec)
- Ki-67 antikor (SP6, ThermoScientific/LabVision)
- P53 antikor (DO-7+BP53-12, ThermoScientific/LabVision)
- HRP Kit (ThermoScientific/LabVision)
- DAB Chromogen (ThermoScientific/LabVision)
- Mayer's Hematoksilen (ThermoScientific/LabVision)
- Citrat Buffer (ThermoScientific/LabVision)

- EDTA Buffer (ThermoScientific/LabVision)
- Hidrojen Peroksit
- PBS (ThermoScientific/LabVision)
- Alkol (Tekkim)
- Ksilol (Tekkim)
- Distile su
- Entellan (Merck)
- Lizinli lam (ThermoScientific)
- Lamel (Isotherm)

Bu çalışma, TSD-09-958 no'lu proje olarak Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir ve Erciyes Üniversitesi Etik Kurulundan onay alınmıştır (Etik Kurul Karar No=09/206).

Çalışmada Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı'nda 2005-2010 yılları arasında nodal DBBHL tanısı almış olan 40 vaka retrospektif olarak incelemeye alındı.

Bu çalışmada 40 DBBHL'lı vaka yaş, cinsiyet, B-semptomları, ektranodal tutulum, LDH seviyesi, evre, sedimantasyon, CRP, lökosit, kemikiliği tutulumu ve sağkalımlarının yanı sıra, immünohistokimyasal olarak; p53 ve P16 tümör supressör gen protein ekspresyonu ile Ki-67 proliferasyon indeksi yönünden değerlendirildi.

Hastalara ilişkin yaş, cinsiyet gibi klinik veriler patoloji bölümüne gelen biyopsi istek formlarından elde edildi. Klinik evre, B-semptomları, LDH düzeyi, ektranodal tutulum, sağkalım, kemik iliği tutulumu, nüks, takip süreleri, sedimantasyon, CRP, lökosit değerlerini öğrenmek için Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesi Hematoloji bölümündeki hasta dosyalarına başvuruldu. Ancak çalışmamızda ilgili parametrelerin kayıtlarına dosya bilgilerinden ulaşılamayan hastalar da mevcuttur. Hastaların yaşam durumları dosyalarındaki bilgilerden veya hastaya telefon ile ulaşılarak öğrenildi. Hastaların takip süresi, tanı anından itibaren ölüme veya son kontrole dek geçen süre belirlenerek ay cinsinden hesaplandı.

Hastaların daha önceden kaydedilmiş olan patoloji raporlarından parafin bloklar ve bloklara ait Hematoksilen-Eozin (HE) boyalı preparatları seçildi. HE boyamasında tümörün en iyi görüldüğü bloklar çalışma için seçildi.

3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL (IHK) YÖNTEM

İmmünohistokimyasal (IHK) yöntem, monoklonal özgül antijenik saptama özelliğine sahip bir belirleyicinin, hücrelerin yüzeyine bağlanması temeline dayanmaktadır. Bu çalışmada tümör hücrelerinde Ki-67, P53 ve P16 varlığı IHK'sal olarak gösterildi. Ki-67; (SP6, dilüsyon: 1/100), P53 (DO-7+BP53-12, dilüsyon: 1/100) ve P16 (CINtec, kullanıma hazır) primer antikor olarak kullanıldı. İmmünohistokimyasal boyamada streptavidin-biotin kiti kullanılarak avidin-biotin peroksidaz yöntemi uygulandı.

- ❖ İmmünohistokimyasal boyama için %10'luk formalin fiksasyonu sonrası rutin takip ile hazırlanmış parafine gömülü bloklardan 4 mikronluk kesitler dokuların dökülmemesi için poli-lizinli lamlara alındı.
- ❖ Kesit 60 derecelik etüvde 1 saat bekletildikten sonra 15 dakika ksilolde deparafinize edilip ardından derecesi giderek azalan %99, %96 ve %70'lik alkol serilerinin her birinde 5'er dakika tutularak dehidrate edildi ve 10 dakika distile suda bekletildi.
- ❖ Kesitler 1 mM citrat ile mikrodalga fırında %50'lik güç seviyesinde 10'ardan toplam 30 dakika kaynatılarak oda sıcaklığında 20 dakika soğumaya bırakıldı.
- ❖ Dokular distile su ile 10 dakika yıkandı ve dokuların çevresi sınırlayıcı kalemle işaretlendi.
- ❖ Kalan işlemler dokuların kurummasını nemli ortam oluşturarak önleyen chamber içerisinde gerçekleştirildi. Kullanılan her bir solüsyon dokunun üzerini tamamen kapatacak şekilde uygulandı.
- ❖ Spesifik olmayan boyamaları önlemek ve zemin boyamasını aza indirmek için endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) ile 10 dakika bloke edildi.
- ❖ Ardında 5 dakika distile su ve 5 dakika fosfat tamponlu tuz solüsyonunda (PBS) yıkandı.

- ❖ Preparatlardaki dokuların üzerine dilüsyonu 1/100 olacak şekilde hazırlanan Ki-67 ve P53 antikorları ile kullanıma hazır olan P16 antikorları damlatılarak buzdolabında bir gece inkübe edildi.
- ❖ 10 dakika PBS ile yıkandı.
- ❖ 10 dakika biotinlenmiş sekonder antikor uygulandı
- ❖ 10 dakika PBS ile yıkandı.
- ❖ 10 dakika streptavidin peroksidaz solüsyonu damlatıldı.
- ❖ 10 dakika PBS ile yıkandı.
- ❖ 10 dakika DAB kromojen uygulandı.
- ❖ 5 dakika distile su ile yıkandı.
- ❖ Daha sonra tüm kesitler zıt boyama sağlamak için Mayer's Hematoksilende 1 dakika bekletildi.
- ❖ Ardından 5 dakika distile su ile yıkandıktan sonra artan alkol serilerinde 5'er dakika bekletilerek ksilolde dokuların parlaması için 15 dakika tutulup ardından da entellan ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı.

3.3. HİSTOSKORLAMA

Boyanan kesitler Patoloji Anabilim Dalı'nda uzman patolog gözleminde yoğunluk derecelerine göre değerlendirildi. Ki-67, P53 ve P16 için nükleer boyanmalar esas alındı. Pozitif hücreleri sayma işlemi ışık mikroskopunda ve büyük büyütme alanında (X400) yapıldı.

P16 protein ekspresyonu ;

%0	Negatif
%0 - %10	Zayıf pozitif
%10 - %100	Pozitif

P16 protein ekspresyonu için, tümör hücreleri %10 veya daha fazla nükleer boyanma gösterirse pozitif kabul edildi, %10'dan daha az boyanma gösteren tümör hücreleri ise zayıf pozitif kabul edildi. Hiç eksprese olmayan hücreler negatif kabul edildi.

P53 protein ekspresyonu:

%1- %10	+1
%10- %50	+2
%50- %90	+3
%90- %100	+4

Ki-67 proliferasyon indeksi:

%1 - %25	+1
%25- %50	+2
%50- %75	+3
%75- %100	+4

Ki-67 ve P53 için boyanma yoğunlukları 1 (zayıf boyanmış), 2 (orta boyanmış), 3 (kuvvetli boyanmış) ve 4 (çok kuvvetli boyanmış) olarak sınıflandırıldı. Her bir preparatdan rastgele toplam 10 alana bakıldı. Hiç boyanma göstermeyen hücreler negatif kabul edildi. Bütün boyamalarda tümöral hücreler dışında boyanma gösteren hücreler değerlendirilmeye alınmadı.

3.4. KONTROLLER

P16 için serviks dokusu, P53 için seröz karsinom ve Ki-67 için tonsil dokusu pozitif kontrol olarak kullanıldı. Hastalara ait klinik parametrelerin P16, P53 ve Ki-67 ekspresyonları ile değerlendirilmesi için aşağıdaki kriterler kullanıldı.

Cinsiyet: Erkek, kadın

Yaş: 60'dan < veya 60'dan >

Evre: 1,2 3,4

B-semptomları: Var, yok

Serum LDH Düzeyi: Normal, yüksek (460 ve üzeri)

Kemik iliği tutulumu: Var, yok

Ekstranodal tutulum: Var, yok

Nüks: Var, yok

IPI: 0, 1, 2, 3, 4

Sağkalım: Ölen veya yaşayan

Takip süresi: Tanı anından itibaren ölüme veya son kontrole dek geçen süre ay cinsinden hesaplandı.

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Klinik parametreler ve sonuçlar retrospektif olarak çalışıldı. Prognostik veriler bilinen klinik parametrelere ve Ki-67, P16, P53 protein ekspresyonuna göre analiz edildi. Sağkalım, Kaplan-Meier metodu kullanılarak Ki-67, P16 ve P53 ekspresyonları için analizlendi. Klinik parametreler ve immunohistokimyasal parametreler arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için Pearson ki-kare testi kullanıldı. Ayrıca klinik parametreler ile Ki-67 ve P53 sonuçları arasındaki ilişki Spearman's rho korelasyon analizi ile de değerlendirildi. Tüm analizler SPSS 15.00 Windows istatistiksel paket programında %95 güven aralığında yapıldı. P değeri < 0.05 olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Hastalara ait klinik parametreler Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Bu çalışmada DBBHL’lı 40 hastanın 19’u 60 yaşından küçük (%47.5), 21’i 60 yaşından büyüktü (%52.5) ve ortalama yaş 60.5 olarak hesaplandı. 40 hastanın 23’ü erkek (%57.5) ve 17’si kadındı (%42.5). Hastalarımızın 9’unda B-semptomları var iken (%22.5), 5’inde B-semptomları yoktu (%12.5). Çalışmadaki hastaların 8’inde ektranodal tutulum var iken (%20), 11’inde ektranodal tutulum yoktu (%27.5). Hastaların 4’ünde nüks var iken (%10), 6’sında nüks olmadığı (%15) bulunmuştur. Hastaların 2’sinde kemik iliği tutulumu mevcut iken (%5), 23’ünde kemik iliği tutulumu yoktu (%57.5). Hastaların 3’ü evre 1’de (%7.5), 6’sı evre 2’de (%15), 11’i evre 3’de (%27.5) ve 4’ü de evre 4’de (%10) bulunmaktaydı. Geriye kalan hastaların klinik parametrelerine dosyalarındaki bilgilerden ulaşılamamıştır. Hastaların IPI değerleri ise; 8 hastada IPI değeri 0 (%20), 12 hastada IPI değeri 1 (%30), 15 hastada IPI değeri 2 (%37.5), 4 hastada IPI değeri 3 (%10), ve 1 hastada IPI değeri 4 (%2.5) olarak hesaplandı. Hastaların 30’unda LDH normal iken (%75), 10’unda yüksekti (%25). Hastaların performans durumları 3’ünde performans 0 (%7.5), 32’sinde performans 1 (%80), 4’ünde performans 2 (%10) ve 1 tanesinde performans 3’dü (%2.5).

Hastaların 5’inde Ki-67 +1 pozitif (%12.5), 7’sinde +2 pozitif (%17.5), 13’ünde +3 pozitif (%32.5) ve 15’inde +4 pozitif (%37.5) yani yüksek ekspresyon saptandı.

<u>Pozitiflik durumu</u>	<u>Hastaların yüzdesi</u>
+1	%12.5 (5)
+2	%17.5 (7)
+3	%32.5 (13)
+4	%37.5 (15)

Hastaların 29'unda P53 +1 pozitif (%72.5), 8'inde +2 pozitif (%20) ve 3'ünde +3 (%7.5) pozitif olarak saptandı.

<u>Pozitiflik durumu</u>	<u>Hastaların yüzdesi</u>
+1	%72.5 (29)
+2	%20 (8)
+3	%7.5 (3)

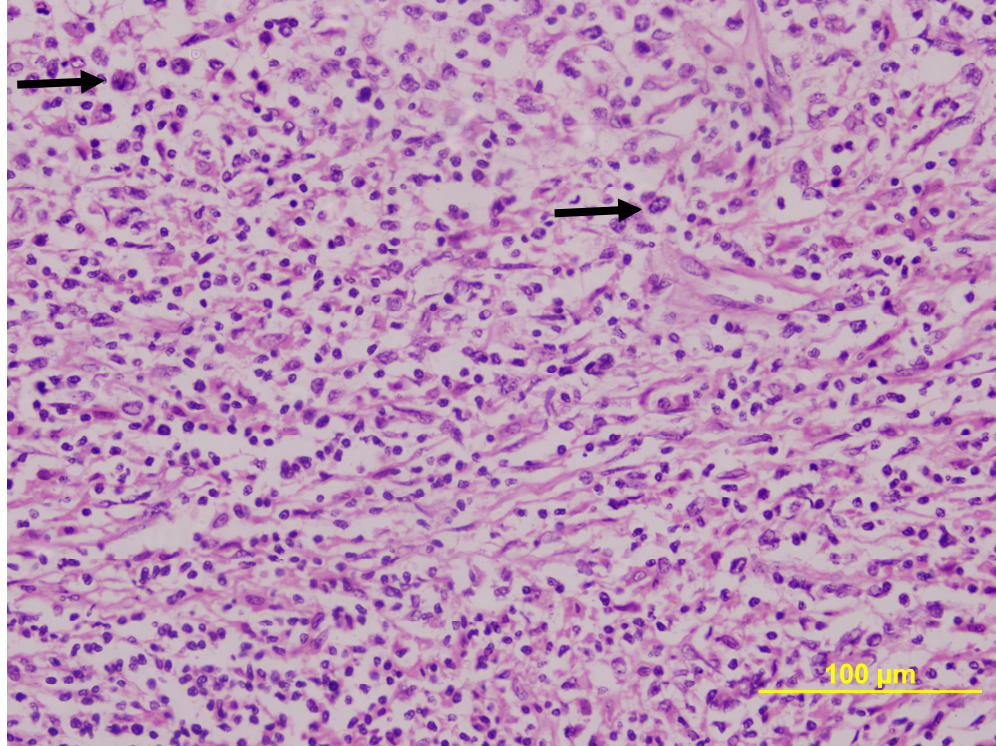
Hastaların 26'sı P16 için hiç ekspresyon göstermezken (%65), 3'ü % 10'un altında (%7.5) düşük, 11'i ise %10'un üzerinde yüksek ekspresyon (%27.5) gösterdi.

<u>Pozitiflik durumu</u>	<u>Hastaların yüzdesi</u>
(%0) Negatif	%65 (26)
%10'un altı	%7.5 (3)
%10'un üzeri	%27.5 (11)

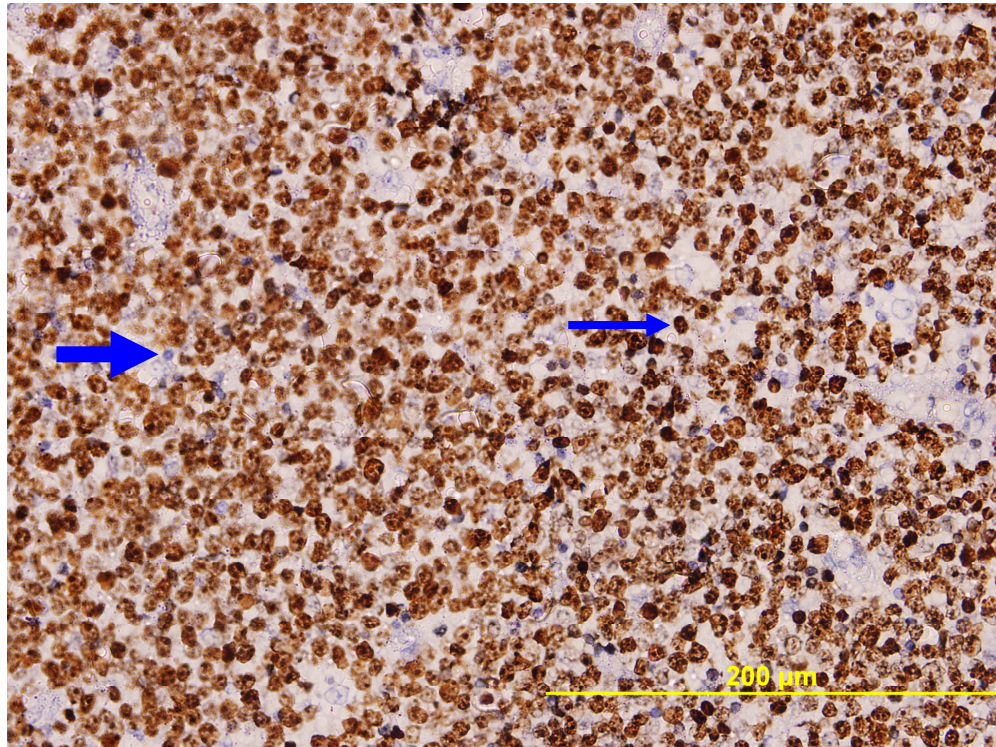
DBBHL'lı hastalara ait preparatlarda HE, Ki-67 pozitif, P53 pozitif ve P16 pozitif boyamaları Resim 4.1- 4.4'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Hastalara ait klinik parametrelerin sayısı ve yüzdesi

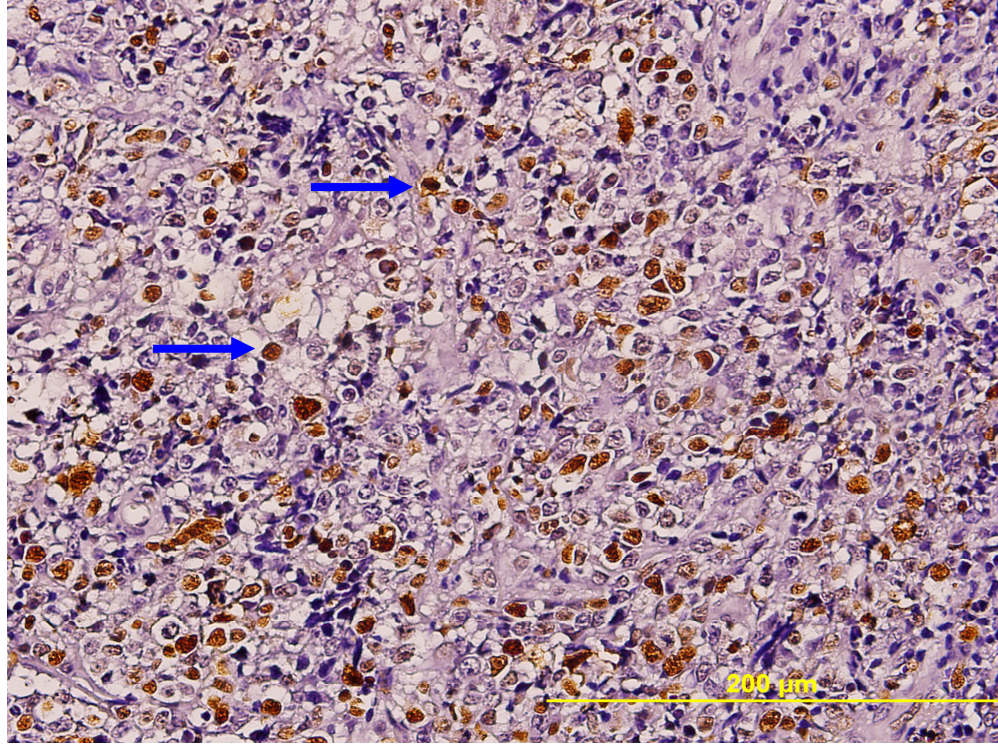
		Sayı	%
Cinsiyet	Erkek	23	57.5
	Kadın	17	42.5
Yaş	60<	19	47.5
	60>	21	52.5
Performans durumu	0	3	7.5
	1	32	80
	2	4	10
	3	1	2.5
B-semptomları	Var	9	22.5
	Yok	5	12.5
Kemik iliği tutulumu	Var	2	5
	Yok	23	57.5
Ekstranodal tutulum	Var	8	20
	Yok	11	27.5
Nüks	Var	4	10
	Yok	6	15
LDH seviyesi	Normal	30	75
	Artmış	10	25
Sağ kalım	Sağ	31	77.5
	Ölü	9	22.5
Evre	1	3	7.5
	2	6	15
	3	11	27.5
	4	4	10
IPI değeri	0	8	20
	1	12	30
	2	15	37.5
	3	4	10
	4	1	2.5



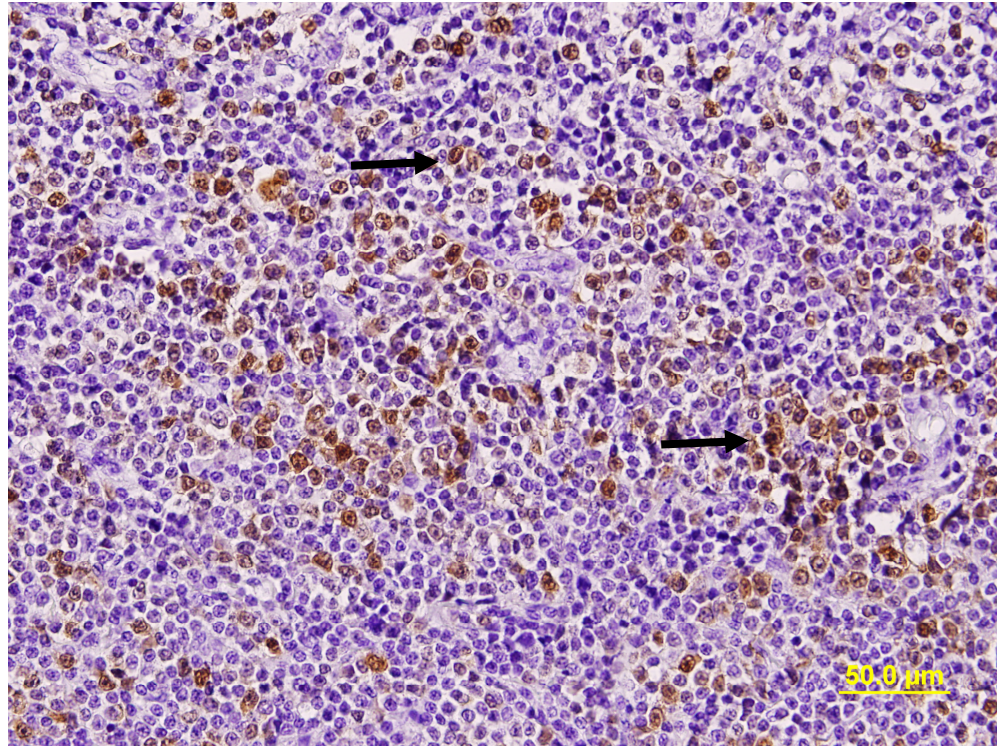
Resim 4.1. DBBHL’larda Hematoksilen-Eozin boyaması (X400).



Resim 4.2. DBBHL’larda Ki-67 pozitif boyaması (X400). (Kalın ok: boyanmayan hücreleri, ince ok: boyanan hücreleri göstermektedir).



Resim 4.3. DBBHL'larda p53 pozitif boyaması (X400).



Resim 4.4. DBBHL'larda p16 pozitif boyaması (X400).

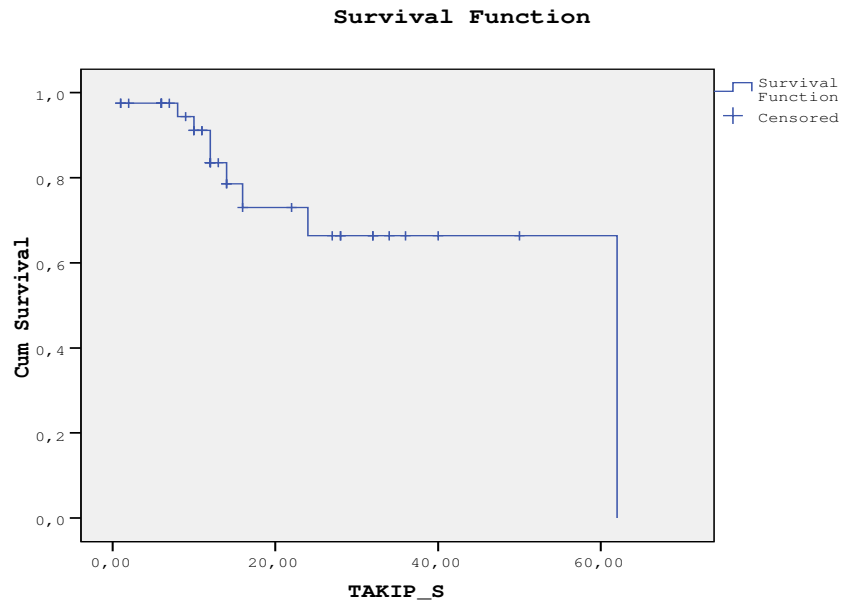
Hastaların ortalama takip süresi 16.97 ay olup, takip sonucunda hastaların 31'i sağ iken (%77.5), 9'u hastalıktan kaybedilmiş olarak saptandı (%22.5).

P53 yüzdesi, Ki67 yüzdesi, takip süresi, lökosit sayısı, CRP, sedimantasyon ve yaşın ortalama ve standart sapma değerleri tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

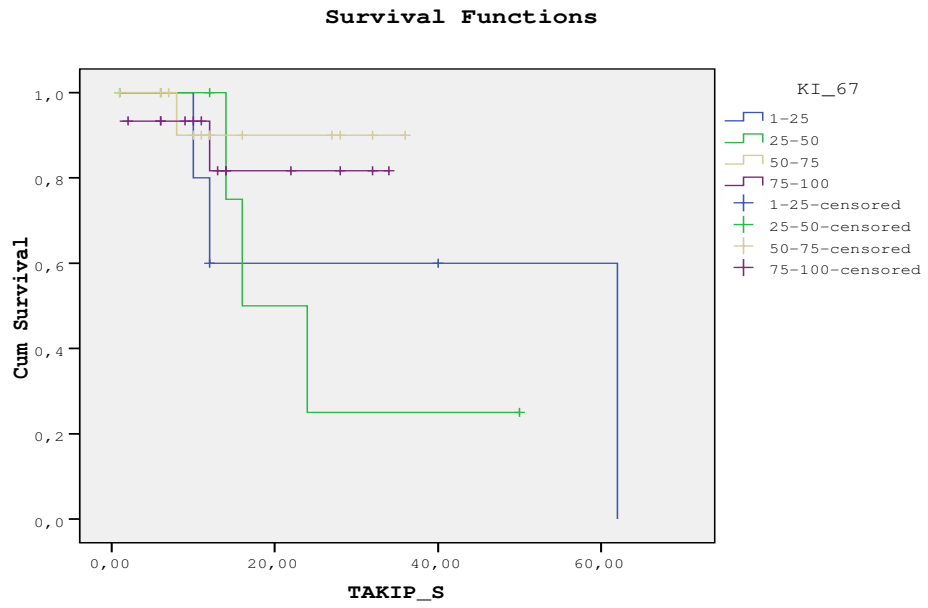
Tablo 4.2. Klinik parametrelerin ortalama ve standart sapmaları.

Klinik parametreler	X±SS
P53	0.1223±1.1916
Ki67	0.5768±0.239
Takip süresi	16.98±13.676
CRP	22.69±39.69
Sedimantasyon	39.051±33.41
Yaş	60.50±16.92
Lökosit sayısı	8.025±6.149

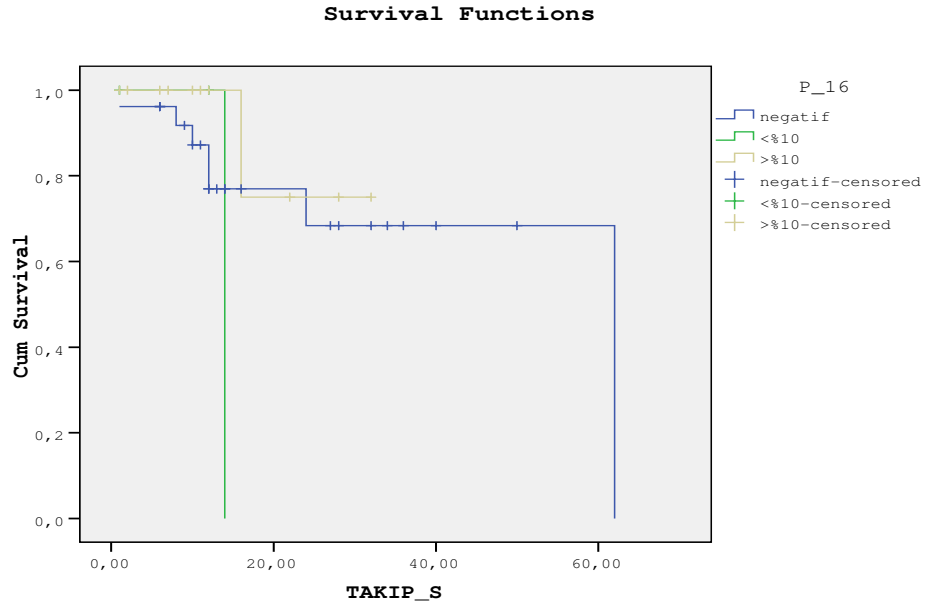
Kaplan-Meier analizi sonucuna göre, Ki-67, P16 ve P53 ekspresyonları ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0.05$). Sonuçlar Şekil 4.1-4.3'de gösterilmiştir.



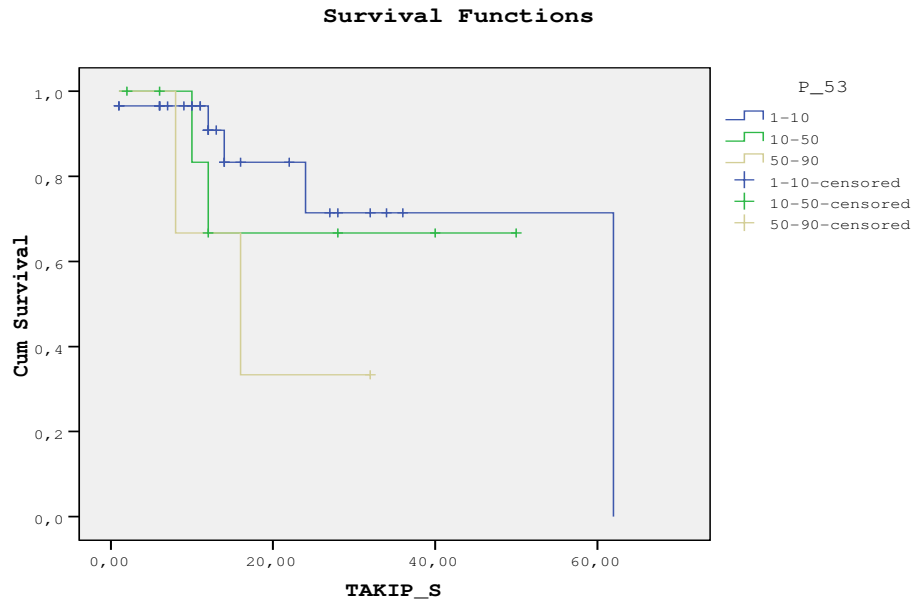
Şekil 4.1. Sağkalım ve takip süresi arasındaki ilişki.



Şekil 4.2. Ki-67 ekspresyonu ve sağkalım arasındaki ilişki ($p = 0.398$).



Şekil 4.3. P16 ekspresyonu ve sağkalım arasındaki ilişki ($p=0.553$).



Şekil 4.4. P53 ekspresyonu ve sağkalım arasındaki ilişki ($p=0.277$).

Bütün klinik parametreler ile Ki-67, P53 ekspresyon sonuçları arasındaki ilişki Sperman's rho korelasyon analizi ile değerlendirildi (Tablo: Ek-1). Korelasyon analizine göre IPI ile yaş arasında ($r=0.416$ ve $p=0.008$) ve IPI ile evre arasında

($r=0.626$ $p=0.001$) ($p<0.01$) anlamlı bir korelasyon bulundu. Yaş ile takip süresi arasında ($r= -0.396$ ve $p=0.011$) ve IPI ile takip süresi arasında ($r= -0.353$ $p=0.025$) negatif bir ilişki saptandı. CRP ile IPI arasında ($r=0.375$ $p=0.032$), CRP ve sedimantasyon arasında ($r=0.364$, $p=0.037$) ve lökosit sayısı ile sedim arasında ($r=0.401$ $p=0.011$) ($p<0.05$) anlamlı bir ilişki saptandı. P53 ve Ki-67 ekspresyonları ile diğer klinik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Klinik parametrelerle yüzde Ki-67 ve P53 ekspresyon değerlerinin korelasyon analizi sonuçları.

Klinik parametreler	r/p	% Ki-67	% P53
Yaş	r	0.084	0.017
	p	0.605	0.919
Takip süresi	r	- 0.133	0.022
	p	0.412	0.894
Evre	r	- 0.268	0.000
	p	0.206	0.998
IPI	r	- 0.103	-0.072
	p	0.529	0.658
Sedimantasyon	r	0.136	0.283
	p	0.409	0.081
CRP	r	0.124	0.176
	p	0.492	0.327
Lökosit sayısı	r	0.139	0.139
	p	0.393	0.391
Performans	r	0.042	0.088
	p	0.798	0.589

Ki-67, P53 ve P16 ekspersyonlarının klinik parametrelerle olan ilişkisi Pearson ki-kare testine göre değerlendirildi. Her bir ekspresyonun ayrı ayrı yüzdeleri; cinsiyet, evre, yaş, IPI, LDH, sağ kalım, performans, B-septomları, kemik iliği tutulumu, ektranodal tutulum, nükse göre ayrı ayrı değerlendirilip p değerleri hesaplandı. Pearson ki-kare

testine göre P16 ve evre arasında anlamlı bir ilişki saptanırken ($p=0.013$), diğer parametreler arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı ($p>0.05$).

Yaşı 60 yaşından büyük ve küçük olanlar şeklinde guplandırdıktan sonra P16, Ki-67, P53 ekspresyonları ile klinik parametreleri Pearson ki-kare testine göre karşılaştırdığımızda; yaş grubu ile IPI arasında anlamlı bir ilişki ($p=0.009$) ve ayrıca yaş grubu ile performans arasında yakın anlamlı bir ilişki saptandı ($p=0.054$).

Ayrıca Mann-Whitney U testinde yaş grubuna göre; IPI, evre, sedim, CRP, lökosit sayısı, %'de Ki-67 ve %'de P53 ekspresyonları karşılaştırıldığında, IPI ile yaş grubu arasında anlamlı bir ilişki ($p=0.029$) ve yaş ve takip süresi arasında anlamlı bir ilişki ($p=0.027$) saptandı. Ayrıca lökosit sayısı ile yaş arasında da anlamlılığa yakın bir ilişki saptandı ($p=0.057$).

Nüks olmadan ölenler ve sağ kalanlar arasında fark olup olmadığı (yani hastalısız sağkalım) istatistiksel olarak hesaplanamadı.

Hastalara ait bütün veriler Ek 2 de gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA

DBBHL, lenfomaların en yaygın tipini ve batılı ülkelerde yeni teşhis edilen lenfomaların yaklaşık olarak %30-40'ını oluşturur (118). DBBHL heterojen klinik özelliklere sahip, tedaviye yanıt ve prognozda belirgin derecede çeşitlilik sergileyen, yüksek dereceli bir neoplazmdır (6, 119). DBBHL'lar yetişkin NHL'ların %40'ını ve çocuk NHL'ların %20'sini oluşturur (37). Kemoterapi ile başarılı sonuçlar alınmasına rağmen hastaların %40'ı kaybedilmektedir. Tedaviye cevap hastalar arasında farklı olduğundan prognostik faktörleri belirlemek için pek çok çalışma yapılmıştır (120).

Ayrıca, klinik ve laboratuvar parametrelerin sağkalım ile ilişkisi de araştırılmaktadır. Bunlardan tümörün agresif potansiyelini, serum LDH seviyesi, ektranodal tutulum sayısı, en büyük tümör kitlesinin çapı ve evre gibi faktörler; hastanın hastalığa yanıtını, performans durumu, B semptomları, anemi, serum CRP seviyesi, eritrosit sedimentasyon hızı gibi faktörler; hastanın tedaviye toleransını, yaşı ile performansı gösterir. Geniş ölçekli bir çalışma ile bu parametreler analiz edilmiş ve öne çıkan parametreler ile IPI indeksi geliştirilmiştir (121).

Yapılan çalışmalar; genetik ve moleküler heterojenitenin, hastalığın agresifliğinde ve tümör progresyonunda etkili olduğunu göstermiştir. Böylece, hastaların sağkalımını belirlemede klinik ve laboratuvar parametrelerinin yanı sıra moleküler ve genetik belirleyicilerin de önemli olduğu düşünülmektedir (76).

Çeşitli malign hastalıklarda yaşın prognostik önemi olduğu belirlenmiştir ve 60 yaş üzerindeki hastalarda, sağkalım süresinin daha kısa olduğu belirtilmektedir (17, 119, 122). DBBHL'lı hastalarda ise çoğu çalışmada yaş ile sağkalım süresi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (121, 123-126). Bu çalışmalarla uyumlu olarak, biz de çalışmamızda yaş ile sağkalım süresi arasında anlamlı bir ilişki bulamadık.

Ancak çalışmamızdaki hasta grubuna ait klinik ve laboratuvar parametrelerinden, yaş grubu ile IPI, performans ve lökosit sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu gösterdik.

DBBHL hastalığında prognoz ve sağkalım süresinin cinsiyete göre değişebildiği bir çalışmada (127) gösterilmesine rağmen çoğu çalışmalarda (121-124) cinsiyet ile sağkalım süresi arasında bizim sonuçlarımızda olduğu gibi anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Şimdiye kadar yapılan çoğu çalışmalarda klinik parametreler (evre, LDH, ektranodal tutulum, B-septomlar, nüks, sedimantasyon ve CRP gibi) ile sağkalım arasında bir ilişki olmadığı gösterilirken (77, 121-126, 128, 129, 131), bazı çalışmalarda bu parametrelerin sağkalım üzerinde etkili olduğu (17, 120, 122-126, 129, 130, 132) gösterilmiştir.

Benzer şekilde, çalışmamızdaki DBBHL'lı hastalarda klinik parametreler ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı. Ancak bu parametrelerden, evre ile IPI, CRP ile IPI ve CRP ile sedimantasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gösterildi. Çalışmamızda ve literatürde şimdiye kadar yapılan çalışmalarda gösterilen çelişkili sonuçların nedeni, hastalığın heterojenitesi, hasta sayılarının farklılığı ve kullanılan IHK'sal kitlerin farklılığı ile açıklama bulabilir.

Zhang ve ark.'nın (14) yaptığı çalışmadaki çok değişkenli analizde sağkalım ve hastalıksız yaşam üzerine en etkili faktörün yaş olduğu, ikinci faktörün ise IPI skorlaması olduğu gösterilmiştir. Bir diğer çalışmada ise, hastalığın prognozunu etkileyen çeşitli klinik değişkenler değerlendirilmiş, ve tüm değişkenler ele alındığında 60 yaşın üzerinde olan hastaların sağkalımlarının anlamlı şekilde etkilendiğini ve IPI skorlamasının sağkalım üzerinde yüksek oranda etkili olduğu gösterilmiştir (122). Bizim çalışmamızda ise, sağkalım ile IPI arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Klinik parametrelerin yanı sıra tümör supressör genler ve onkogenlerin ekspresyonları ile hastalığın prognozunu, tümörün biyolojik davranışını ve yeni tedavi ajanlarını belirlemek için immunohistokimyasal ve moleküler teknikler kullanılmaktadır (14, 120).

İnsan kanserlerinin ön tanısında bir belirteç olarak kullanılan P53 ekspresyonu, hasta sağkalımı üzerine negatif bir etkiye sahiptir (133-136). Ancak, DBBHL'larda P53 mutasyonunun sağkalım üzerine etkisi tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda P53 protein

ekspresyonu bağımsız prognostik faktör olarak değerlendirilirken (14, 17), diğer çalışmalarda ise hiçbir prognostik önemi olmadığı belirtilmiştir (15, 137, 138).

Yapılan birçok çalışmada DBBHL'larda P53 ekspresyonunun daha kısa sağkalım ile ilişkili olduğu (14, 17, 98, 139-143), ancak diğer çalışmalarda bizim sonucumuza benzer şekilde P53 ekspresyonu ile sağkalım arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (123, 144-146).

NHL'ların alt gruplarından oluşan 600 vakayı aşan bir çalışmada yapılan mikroarray analizleri sonucunda P53 ve yüksek IPI'nın kötü sağkalım için bağımsız bir belirleyici olduğu ve P53'ün DBBHL'larda bağımsız negatif prognostik faktör olduğu açıklanmıştır (147).

Ki-67, 10. kromozom üzerinde 345-395 kd ağırlığında bir gendir. Hücre proliferasyonu ile ilişkili nükleer bir antijendir. Çalışmaların bazılarında kötü prognostik öneme sahip olduğu bulunmuştur (148-151). Bazı çalışmalarda ise DBBHL'lı hastaların yüksek proliferasyon indeksi ile toplam sağkalım arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (17, 121, 122, 125).

Zhang ve ark'larının (14), DBBHL'larda düşük Ki-67 ekspresyonunun (%10'un altı), yüksek proliferatif aktivite gösterenlerden daha kısa sağkalım ile ilişkili olduğu görülmüş fakat istatistiksel olarak ispatlanamamıştır. Bu bulgular düşük Ki-67 indeksi ile ilişkili NHL'lı hastalarda kötü prognozu göstermektedir.

Ki-67 proliferasyon hızının prognozla ilişkisine dair yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Yüksek proliferasyon indeksinin agresif lenfomalarda sağkalım düşüklüğü ile birlikteliğini gösteren çalışmalar olduğu gibi düşük proliferasyon indeksinin düşük sağkalım ile birlikteliğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (123, 148, 152).

Yetişkin büyük hücreli NHL'lı hastalarda P53 ve Ki-67'nin ekspresyonlarının beraber değerlendirildiği bir çalışmada, P53 ve Ki-67'nin yüksek ekspresyonunun sağkalımın aleyhine olduğu gösterilirken (153), diğer bir çalışmada DBBHL hastalarında P53 ve Ki-67 ekspresyonlarının yüksekliğinin genel sağkalım ile ilişkili olmadığı bulunmuştur (154).

Çalışmamızda DBBHL'lı hastalarda Ki-67 ekspresyonu ile sağkalım arasında bir ilişki olmadığını gösteren bulgularımıza benzer şekilde, çoğu çalışmada Ki-67 indeksinin hasta sağkalımında önemli olmadığı gösterilmiştir (155-158).

P16 bir diğer tümör supressör gendir. Kromozom 9p21 bölgesinde lokalize olan CDK2A geni CDK 4 inhibitörü 156 aa'lık bir protein olan P16/INK4A'yı kodlar. P16, negatif bir hücre döngüsü düzenleyicisidir. Bazı çalışmalarda P16'nın hem B-hatlarında hem de T-hatlarında kritik rol oynadığı gösterilmiştir. NHL'lardaki P16 değişikliklerinin insidansı (%6) çok düşük olarak saptanmıştır (159). P16/INK4A inaktivasyonu, P16'nın transkripsiyonel blokajına, 5'CpG adalarında de-novo metilasyonda artışa neden olmaktadır (160). Lenfomalarda allelik kayıplar ve promotor hipermetilasyonu sıklıkla olurken mutasyonlar nadiren olmaktadır. Lenfomalarda P53 geni vakaların %19-35'inde mutant bulunurken (161), P16 vakaların %14-85'inde sessizdir (160, 162-164).

B-hücreli NHL'larda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Shouthernblot yöntemi kullanılarak değerlendirilen P16 bozukluğu normalde %13 iken mevcut serilerde %8 bulunmuştur. DBBHL'larda sadece bir çalışmada P16 bozukluğu %15 olarak bulunmuştur (165).

Geniş hasta grubundan (n=214) oluşan DBBHL hastalarında P16, P21, P27, P14 ve P53'ün immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi sonucunda, P53'ün anormal ekspresyonun, P16, P14'ün ekspresyon kaybınının DBBHL'ların GC fenotipinde kötü sağkalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir (166).

Yine immonohistokimyasal olarak NHL hastalarında yapılan bir çalışmada, P16/INK4A ekspresyon kaybının P53 mutasyonu ile paralel olarak tümör progresyonuna katkı sağladığı bulunmuştur (160).

Ancak biz çalışmamızda P53'ün aşırı ekspresyonu ve P16'nın ekspresyon kaybı ile sağkalım arasında bir ilişki bulamadık.

Bir başka çalışmada, PZR ve metilasyon analizleri ile P16 hipermetilasyonlu DBBHL hastalarının, metile olmamış aynı risk grubunda olan hastalardan daha kısa sağkalıma sahip olduğu gösterilmiştir ve böylece P16'nın IPI ile birlikte kullanıldığında faydalı bir belirleyici olabileceği önerilmiştir (167).

P16/INK4A'nın yaşa bağlı ekspresyonu ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada P16 ekspresyonunun yaş ile arttığı gösterilmiştir. Ancak çalışmamızda P16 ekspresyonunun yaşa bağlı olmadığı istatistiksel olarak bulunmuştur (168).

DBBHL'larda P16 ve P53 ekspresyon değişimlerinin daha kötü prognoz sergilediği gösterilirken (169-171), tersine bazı çalışmalarda P16 genindeki değişikliklerin ve P16

protein kaybının lösemilerde ve insan lenfomalarında prognostik öneminin olmadığı sonucuna varılmıştır (172, 173).

Bizim çalışmamızda ise sadece P16 ve evre arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu. Bu sonuçlarımıza göre, DBBHL'lı hastalarda P16 ekspresyon kaybının artışı ve dolayısıyla P16 protein kaybının, hastalardaki evre artışı (ekstranodal tutulum artışı) ile uyumlu olduğunu ve kötü prognoz ile ilgili olabileceğini söyleyebiliriz.

Günümüzde hastalığın bireylerde nasıl seyredeceğini bilmek ve buna yönelik optimal tedavileri bulmak önem kazanmıştır. Bu amaca yönelik pek çok klinik ve bireysel çalışmalar düzenlenmiş ve hala da düzenlenmektedir. Tanı sırasında moleküler prognostik belirteçlerin saptanması ve bunun klinikopatoloji ile birleştirilmesi sonucunda elde edeceğimiz veriler hekimlerimize hastaya göre tedavi uygulama olanağı sunacaktır.

Sonuç olarak; çalışmamızda Ki-67 proliferasyon indeksinin, P53 ve P16 protein ekspresyonlarının DBBHL'lı hastaların yaşam süresi üzerinde etkili olmadığı ve klinik parametrelerle zayıf ilişkili olduğu bulunmuştur. Ancak klinik parametrelerin çeşitliliği, bu parametrelerden bazılarına hasta dosyalarından ulaşılamaması nedeniyle DBBHL'lı hastaların prognozu üzerinde bu parametrelerin etkilerini yorumlamada zorluk çekilmektedir. DBBHL'lı hastaların prognostik öneminin daha iyi anlaşılabilmesi için eksiksiz dosya bilgilerine ulaşılabilmesinin yanısıra standart cut-off değerlerinin kullanıldığı daha geniş serili çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Youmans H, Richard Winn. Neurological Surgery. Philadelphia. W.B. Saunders company 2003; 969.
2. Greenlee RT, Murray T, Bolden S. Cancer statistics. CA Cancer J Clin 2000; 50: 7-33.
3. Beers MH, Berkow R. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. 17th. ed. Merck & Co 2002: 1002-1015.
4. Weisenburger DD. Pathological Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma for Epidemiological Studies. Cancer research 1992; 52: 5456-5461.
5. Yamaç K. Hodgkin-dışı lenfoma. İçinde İliçin G, Biberoğlu K, Süleymanlar G, Ünal S(yazarlar). İç hastalıklar Ankara Güneş Kitapevi 2003: 1913-1928.
6. Gatter KC, Warnke RA. Diffuse large B-cell lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press 2001: 171-174.
7. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. J Clin Oncol 1998; 16: 2780-2795.
8. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood 1994; 84: 1361-1392.
9. WHO: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC, Lyon, 2008.
10. Kuzu I. Hodgkin dışı lenfoma sınıflamasında son gelişmeler. Hematoloji-Onkoloji 2000; 2: 256-267.
11. Shipp MA. Prognostic factors in aggressive non-hodgkin's lymphoma: who has high risk disease? Blood 1994; 83: 1165-1173.

12. Foon KA, Fisher RI. Lymphomas. In Beutner E, Litchman MA, Collier BS, Kipps TJ. (eds). Williams Hematology. 6th. ed. New York: Mc Graw-Hill Companies. 2001; 1327-1262.
13. Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood* 2003; 101: 1220-1235.
14. Zhang A, Ohshima K, Sato K, et al. Prognostic Clinicopathologic factors, including immunologic expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Pathology International* 1999; 49: 1043-1052.
15. Kramer MH, Hermans J, Parker J, et al. Clinical significance of bcl-2 and P53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2131-2138.
16. Gacoyne RD, Krajewska M, Krajewski S, et al. Prognostic significance of bax protein expression in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 92: 3173-3178.
17. Piris MA, Pezella F, Martinez-Montero JC, et al. P53 and bcl-2 expression in high-grade B-cell lymphomas: correlation with survival time. *Br J Cancer* 1994; 69: 337-341.
18. Hermine O, Haioun C, Lepage E, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Group d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood* 1996; 87: 265-272.
19. Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, et al. Prognostic significance of Bcl-2 expression and Bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* 1996; 88: 1046-1051.
20. Bremnes RM, Bremnes Y, Donem T. High-grade Non-Hodgkin's Lymphoma Treated in Northern Norway. Treatment, Outcome and Prognostic Factors. *Acta Oncologica* 1999; 38: 117-124.
21. Shipp MA. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993; 329: 987-994.

22. Harris NL, Stein H, Banks PM, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 1994; 435: 549-558.
23. Jemal A, Thomas A, Murray T, et al. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures Atlanta* 2002.
24. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. Lymphoma classification-from controversy to consensus: the REAL and WHO Classification of lymphoid neoplasms. *Ann Oncol* 2000; 11: 3-10.
25. Clarke CA, Glaser SL. Changing incidence of non-Hodgkin lymphomas in the United States. *Cancer* 2002; 94: 2015-2023.
26. Groves FD, Linet MS, Travis LB, et al. Cancer surveillance series: non-Hodgkin's lymphoma incidence by histologic subtype in the United States from 1978 through 1995. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1240-1251.
27. Howel HL, Wingo PA, Thun MJ. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 824-842.
28. Van Gorp J, Doornewaard H, Verdonck LF, et al. Posttransplant T-cell lymphoma. *Cancer* 1994; 73: 3064-3072.
29. Beral V, Peterman T, Berkelman R, Jaffe H. AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma. *Ancient* 1991; 337: 805-809.
30. Koen van B, Fernando C. Clinical manifestations, staging, and treatment of non-Hodgkin lymphoma. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P. *Hematology Basic Principles and Practice*, 3rd edition, Philadelphia, Churchill Livingstone 2000: 1293-1339.
31. Gall E, Mallory T. Malignant lymphoma. A clinicopathologic survey of 618 cases. *Am J Pathol* 1942; 18: 381.
32. Rappaport H. Tumours of the hemapoetic system. *Atlas of Tumor Pathology*, Sec 3, Fasc 8, Armed Forces Institute of Pathology (AFIP) 1966: 97-98.

33. Hicks EB, Rappaprot H, Winter WJ. Follicular lymphoma; a re-evaluation of its position in the scheme of malignant lymphoma, based on a survey of 253 cases. *Cancer* 1956; 9: 792-821.
34. Lukes RJ, Collins RD. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer* 1974; 34(Suppl 4): 1488-1503.
35. Lennert K, Stein H. Malignant Lymphomas other than Hodgkin's Disease: Histology, Cytology, Ultrastructure, Immunology. New York: Springer-Verlag: 1978.
36. Chan JKC. The new world health organization classification of lymphomas: the past, the present and the future. *Hematol Oncol* 2001; 19: 129-150.
37. Rosenberg S, Berard C, Brown Jr. B, et al. Non-hodgkin's lymphoma pathologic classification project National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: Summary and description of working formulation for clinical usage. *Cancer* 1982; 49: 2112-35.
38. Tondini C, Zanini M, Lombardi F, et al. Combined modality treatment with primary CHOP chemotherapy followed by locoregional irradiation in stage I or II histologically aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 1993; 11: 720-25.
39. O' Reilly SE, Hoskins P, Klimo P, et al. MACOP-B and VACOP-B in diffuse large cell lymphomas and MOPP/ABVD in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 1991; 2(suppl 1): 17-23.
40. Straus DJ, Filippa DA, Lieberman PH, et al. The non-Hodgkin's lymphomas. I.A retrospective clinical and pathologic analysis of 499 cases diagnosed between 1958 and 1969. *Cancer* 1983; 51: 101-109.
41. Weis LM, Arber Da, Chang KL. Lymph Nodes and Spleen. Silverberg in Principles and pratce of Surgical Pathology and Cytopathology 3rd Edition. Ed: Silverberg RA, Delellis WJ. New York. Churchill Livingstone Inc 1997; 108: 675-772.
42. Jaffe ES, Haris NL, vardiman JW. Tumours of Haemapoietic and Lymphoid Tissues, World Health Organization of Tumours, IARC Pres 2001; S: 171-175, 181-185.

43. Knowles DM. Diffuse Large Cell Lymphoma. In: Neoplastic Haematopathology, second edition 2001.
44. Warnke RA, Weiss LM, Chan J, et al. Atlas of Tumor Pathology, Tumors of the Lymph nodes and spleen, AFIP 1995; S: 153-221.
45. A clinical evaluation of the International lymphoma study group classification of non-Hodgkin's lymphoma: the non-Hodgkin's lymphoma classification project. Blood 1997; 89: 3909-3918.
46. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European American Classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood 1994; 84: 1361-1392.
47. Kumar V. (Disease of White Blood Cells, Lymph Nodes, Spleen and Tymus) Pathologic of Disease Seventy Edition 2005; 661-710.
48. Dominis M, Dzebro S, Gasparov S, Pesut A, Kusec R. Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Its Variants. Croatian Medical Journal 2002; 43 (5): 535-540.
49. Mills SE. Lymph nodes. In: Stenberg's Diagnostic Surgical Pathology, fourth edition, Lippincott Williams&Wilkins 2004, S: 777-849.
50. Rosai J. Lymph nodes. In: Rosai J, ed Ackerman's Surgical Pathology, ninth edition, St. Louis: C.V. Mosby 2004; 2(28): 505-513.
51. Schlegelberger B, Zwingers T, Harder L, et al. Clinicopathogenetic significance of chromosomal abnormalities in patients with blastic peripheral B-cell lymphoma. Kiel-Wien-Lymphoma Study Group. Blood 1999; 94: 3114-3120.
52. Salar A, Fernandez de Sevilla A, Romagosa V, et al. Diffuse large b-cell lymphoma: Is morphologic subdivision useful in clinical management? Eur J Haematol 1998; 60: 202-208.
53. Burns B, Warnke R, Doggett R, Rouse R. Expression of a T-cell antigen (Leu-1) by B-cell lymphomas. Am J Pathol 1983; 113:165-171.
54. Harada S, Suzuki R, Uehira K, et al. Molecular and immunological dissection of diffuse large B cell lymphoma: CD5+, and CD5- with CD10+ groups may constitute clinically relevant subtypes. Leukemia 1999; 13: 1441-47.

55. Stein H, Mason DY, Gerdes J, et al. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 1985; 66(4): 848-58.
56. Bears M H, Berkow R (eds) . *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*. 17th ed. West Poin. Merck & Co 1999: 847-1000.
57. Greer JP, Macon WR, List AF. Non-Hodgkin lymphomas. In GR Lee et al, eds, *Wintrobe's Clinical Hematology* 1999; 2; 2447-2537.
58. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, et al. Report of the Committee on Hodgkin's disease Staging Classification. *Cancer Res* 1971; 31: 1860-1861.
59. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 1982; 5: 649–655.
60. Coiffier B, Bastion Y, Berger F, Felman P, Byron PA. Prognostic factors in follicular lymphomas. *Semin Oncol* 1993; 20: 89 -95.
61. Stein RS, Greer JP, Flexner JM. Large cell lymphomas: Clinical and prognostic feature. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1370-1379.
62. Falconer JS, Fearson KG, Ross JA, et al. Acute-phase protein response and survival duration of patients with pancreatic cancer. *Cancer* 1995; 75: 2077-2082.
63. Armitage JO and Cheson BD. Interpretation of clinical trials in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1335-47.
64. Miller TP, Dahlberg S, Cassady JR, et al. Chemotherapy alone compared with chemotherapy plus radiotherapy for localized intermediate-and high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl Med* 1998; 339: 21-26.
65. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlberg S, et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993; 328: 1002-1006.
66. Gianni AM, Bregni M, Siena S, et al. High-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation compared with MACOP-B in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1997; 336: 1290-1297.

67. Haioun C, Lepage E, Gisselbrecht C, et al. Benefit of autologous bone marrow transplantation over sequential chemotherapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: updated results of the prospective study LNH87-2, the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1131-1137.
68. Tilly H, Lepage E, Coiffier B, et al. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. Intensive conventional chemotherapy (ACVBP regimen) compared with standard CHOP for poor-prognosis aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 2003; 102: 4284-4289.
69. Gascoyne RD. Emerging prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2004; 16: 436-441.
70. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503-511.
71. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346: 1937-1947.
72. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002; 8: 68-74.
73. Grace Wu, Armand K. Biomarkers of potential prognostic significance in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer* 2006; 106: 247-257.
74. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; 103: 275-282.
75. Ramsay AD, Smith WJ, Isaacson PG. T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 1988; 12: 433-443.
76. Lossos IS and Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 995-1007.
77. Engelhard M, Brittinger G, Huhn D, Gerhartz HH, et al. Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. *Blood* 1997; 89: 2291-2297.

78. Chaganti RS, Nanjangud G, Schmidt H, Teruya-Feldstein J. Recurring chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphoma: biologic and clinical significance. *Semin Hematol* 2000; 37: 396-411.
79. Kumar V, Cotran R S, Robbins S L: Basic Pathology. 7th edition, Saunders Elsevier, Philadelphia 2003.
80. Cooper GM. ve Hausman R E. Hücre=Moleküler Yaklaşım (Çeviri Editörleri M. Sakızlı ve N. Atabey) İzmir Tıp Kitapevi, İzmir 2006; 591-629.
81. Coats S, Roberts J. Cell cycleregulation (Ed. Heldin CH and purton M). *Signal Transduction*, Chapman&Hall LTD. Pres 1996; 347-357.
82. Kumar V, Abbas A K, Fausto N. Neoplasia. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th ed. Philadelphia, 2005, Elsevier Saunders pp. 269-342.
83. Ouelle DE. Alternative reading frames of INK4A tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of including cell cycle arrest. *Cell* 1995; 83: 993-1000.
84. Rocco W J, Sidransky D. P16 (MTS-1/ CDKN2/INK4A) in cancer progression. *Experimental Cell Research* 2001; 264: 42-55.
85. Bettendorf O, Piffko J, Bankfalvi A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? *Oral Oncology* 2004; 40: 110–119.
86. Mao L. Leukoplakia: molecular understanding of pre-malignant lesions and implications for clinical management. *Molecular Medicine Today* 1997; 3: 442-446.
87. Tsao A S, Kim E, Hong W K. Chemoprevention of Cancer. *C A. Cancer J Clin* 2004; 54: 150–180.
88. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
89. Allen RT, Hunter WJ III, Agrawal DK. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *Pharmacol Toxicol Meth* 1997; 37: 215-228.

90. Cohen JJ. Apoptosis; mechanism of life and death in immune system. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 548-54.
91. Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson W G, Isaacs W I, De Marzo A. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Letters* 2004; 215: 1–20.
92. Meric JB, Rottey S, Olausson K, et al. Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. *Critical Reviews in Oncology / Hematology* 2006; 59: 51-64.
93. Schliephake H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer-A review. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg* 2003; 32: 233–245.
94. Moller MB, Skjodt K, Mortensen LS, Pedersen NT. Clinical significance of cyclin-dependent kinase inhibitor P27Kip1 expression and proliferation in non-hodgkin's lymphoma: independent prognostic value of P27Kip. *Br J Haematol* 1999; 105(3): 730-736.
95. Miller G, Mohands T, Wolf D, et al. Human P53 localized to short arm of chromosome 17. *Nature* 1986; 319: 783-784.
96. Chang F, Syrjanen S, Tervahauta A, Syrjanen K. Tumourigenesis associated with the P53 tumour suppressor gene. *Br J Cancer* 1993; 68: 653-661.
97. Villuendas R, Piris MA, Algara P, et al. The expression of P53 protein in non-hodgkin's Lymphomas is not always dependent on P53 gene mutations. *Blood* 1993; 82: 3151-3156.
98. Koduru PRK, Raju K, Vadmal V, et al. Correlation between mutation in P53 expression, cytogenetics, histologic type, and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1997; 90: 4078-4091.
99. Baker S, Fearson E. Chromosome 17 deletion and P53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 261: 3099-3103.
100. Wu G, Kreating A. Biomarkers of potential prognostic significance in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer* 2006 Jan 15; 106(2): 247-57.
101. Soini Y, Paakko P, Alavaikko M, Vahakangas K. P53 expression in lymphatic malignancies. *J Clin Pathol* 1992; 45: 1011-1014.

- 102.** Holstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. P53 mutations in human cancers. *Sciens* 1991; 253: 49-53.
- 103.** Lane D, Crawford L. The antigen in bound to host prtein SV40 transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-263.
- 104.** Mc Cluggage WG. Immunohistochemistry as a diagnostic aid in cervical pathology. *Pathology* 2007; 39: 97-111.
- 105.** O'Neill JC, Mc Cluggage WG. P16 expression in the famele genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2006; 13: 8-15.
- 106.** Khleif SN, Degregori J, Yee CL. Inhibition of cyclin D- CDK4/6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Cell Biology* 1996; 93: 4350-4354.
- 107.** Murphy N, Ring M, Heffron CC, et al. P16INK4A, CDC6, and MCM5: Predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2005; 58: 525-534.
- 108.** Focchi GR, Silva ID, Nogueira-de-Souza NC, Dobo C, Oshima CT, Stavale JN. Immunohistochemical expression of P16INK4A in normal uterine cervix, nonneoplastic epithelial lesions, and low-grade squamous intraepithelial lesions. *J Low Genit Tract Dis* 2007; 11: 98-104.
- 109.** Lambert AP, Anschau F, Schmitt VM. P16INK4A expression in cervical premalignant and malignant lesions. *Exp Mol Pathol* 2006; 80: 192-196.
- 110.** Carrozzi F, Cecchini S, Confortini M, et al. Role of P16INK4A expression in identifying CIN II or more severe lesions among HPV-Positive patients referred for colposcopy after abnormal cytology. *Cancer* 2006; 108: 119-23.
- 111.** Dray M, Russell P, Dalrymple C, et al. P16INK4A as a complemantary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies. *Pathology* 2005; 37: 112-124.
- 112.** Brown DC, Gatter KC. Ki-67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 2002; 40: 2-11.

113. Kasch I, Lingnau A, Endl E, et al. Antisense Treatment Against Ki-67 mRNA Inhibit Proliferation and Tumor Growth In Vitro and In Vivo. *International Journal of Cancer* 2003; 105: 710-716.
114. Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, et al. Cancer. The prognostic significance of MIB-1, P53, and DNA flow cytometry in completely resected primary meningiomas. 1998; 82: 2262–9.
115. Ho MD, Hsu CY, Ting LT, Chiang H. Cancer. Histopathology and MIB-1 labelling index predicted recurrence of meningiomas: a diagnostic criteria for patients with atypical meningiomas. 2002; 94(5): 1538-1547.
116. Roggendorf W, Schuster T, Peiffer J. *Acta Neuropathol (Berl)*. Proliferative potential of meningiomas determined with the monoclonal antibody Ki-67. 1987; 73: 361–364.
117. Hagberg H, Glimelius B, Gronowitz S, et al. Biochemical markers in non-Hodgkin's lymphoma stages III and IV and prognosis: a multivariate analysis. *Scand J Haematol* 1988; 33(1): 59-67.
118. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distribution of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project *Ann Oncol* 1998; 9(7): 717-720.
119. Rosai J. The Lymph Nodes. in: Rosai and Ackerman's *Surgical Pathology* ninth edition. Ed: Houston M. Mosby, London, New York, Oxford, Philadelphia 2004: 1877-201.
120. Nakamine H, Bagin RG, Vose J, et al. Prognostic significance of clinical and pathologic features in diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer* 1993; 71: 3130-3137.
121. Vose JM, Armitage JO, Weisenburger DD, et al. The importance of age in survival of patients treated with chemotherapy for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1838.
122. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003; 101: 78-84.

123. Sanchez E, Chancon I, Plaza MM, et al. Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. *Clin Oncol* 1998; 16: 1931-1939.
124. Ahn M, Kim H, Kim I, et al. P53 protein expression and its prognostic importance in patients with nodal non-Hodgkin's lymphoma. *J Korean Med Sci* 2000; 15: 59-64.
125. Seki R, Okamura T, Koga H, et al. Prognostic significance of the F-box protein Skp2 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol* 2003; 73(4): 230-5.
126. Uncu D, Abalı H, Özdemir N, ve ark. Non-Hodgkin lenfoma prognostik parametreler. *Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi* 2006; 16(1): 27-31.
127. Tomita N, Kodama F, Motomura S, et al. Prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma treated by risk-adopted therapy. *Intern Med* 2005; 45: 247-252.
128. Korkolopoulou P, Angelopoulou MK, Kontopidou F, et al. Prognostic relevance of apoptotic cell death in non-Hodgkin's lymphomas: a multivariate survival analysis including Ki67 and P53 oncoprotein expression. *Histopathology* 1998; 33(3): 240-7.
129. De Paepe P, Achten R, Verhoef G, et al. Large cleaved and immunoblastic lymphoma may represent two distinct clinicopathologic entities within the group of diffuse large B-cell lymphomas. *Clin Oncol* 2005 Oct 1; 23(28): 7060-8.
130. Shioyama Y, Nakamura K, Kunitake N, et al. Relapsed Non-Hodgkin's Lymphoma: Detection and Treatment. *Radiation Medicine* 2000; 6: 369-375.
131. Ke X, Wang J, Gao Z, et al. Clinical characteristics and prognostic analysis of Chinese patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2010; 44: 55-61.
132. Legouffe E, Rodriguez C, Picot MC, et al. C-reactive protein serum level is a valuable and simple prognostic marker in non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk lymphoma* 1998; 31(3-4): 351-7.

133. Galic V, Willner J, Wollan M, et al. Common polymorphisms in TP53 and MDM2 and their relationship to TP53 mutations and clinical outcomes in Women with ovarian and peritoneal carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; 46(3): 239-47.
134. Tommiska J, Eerola H, Heinonen M, et al. Breast cancer patients with P53 pro 72 homozygous genotype have a poorer survival. *Clin Cancer Res* 2005; 11(4): 5098-103.
135. Toyama T, Zhang Z, Nishio M, et al. Association of TP53 codon 72 polymorphism and the outcome of adjuvant therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2007; 9(3): R34.
136. Wang YC, Chen CY, Chen SK, et al. P53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: association with lung cancer susceptibility and prognosis. *Clin Cancer Res* 1999; 5(1): 139-34.
137. Kochethu G, Delgado J, Pepper C, et al. Two germ line polymorphisms of the tumour suppressor gene P53 may influence the biology of chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res* 2006; 30(9): 1113-8.
138. Sturn I, Bosanquet AG, Hummel M, et al. In B-CLL, the codon 72 polymorphic variants of P53 are not related to drug resistance and disease prognosis. *BMC Cancer* 2005; 5: 105.
139. Leroy K, Haioun C, Lepage E, et al. P53 gene mutations are associated with poor survival in low and low-intermediate risk diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Oncol* 2002; 13: 1108-1115.
140. Young KH, Weisenburger DD, Dave B, et al. Mutations in the DNA-binding codons of TP53 which are associated with decreased expression of TRAF2 predict for poor survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2007; 110(13): 4396-405.
141. Maartense E, Kramer MH, Ie Cessie S, et al. Lack of prognostic significance of Bcl-2 and P53 protein overexpression in elderly patients with diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results from a population-based non-Hodgkin's lymphoma registry. *Leuk Lymphoma* 2004; 42(1): 101-107.

142. Ichikawa A, Kinoshita T, Watanabe T, et al. Mutations of the P53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1997; 337: 529-534.
143. Wilson WH, Teruya-Feldstein J, Fest T, et al. Relationship of P53, bcl-2 and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1997; 89: 601-609.
144. Sohn SK, Jung JT, Kim DH, et al. Prognostic significance of bcl-2, bax, and P53 gene expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol* 2003; 73(2): 101-107.
145. Barrans SL, Carter I, Owen RG, et al. Germinal center phenotype and Bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index improves risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2002; 99(4): 1136-43.
146. Osada M, Ishioka C, Ichinohasama R, et al. Influence of P53 mutation on pathological grade, but not prognosis of non-Hodgkin's lymphoma. *Anticancer Drug Des* 1999; 14(2): 107-14.
147. Went P, Dellas T, Bourgau C, et al. Expression profile and prognostic significance of CD24, P53 and P21, in lymphomas. A tissue microarray study of over 600 non-Hodgkin's lymphoma. *Dtsch med Wochenschr* 2004 Oct 1; 129(40): 2094-9.
148. Miller TP, Grogan TM, Dalhberg S, et al. Prognostic significance of the Ki-67 associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group Trial. *Blood* 1994; 83: 1460-1466.
149. Grogan TM, Lippman SM, Spier CM, et al. Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large B-cell lymphoma as determined by the monoclonal antibody Ki-67. *Blood* 1988; 71: 1157-1160.
150. Yamanaka N, Harabuchi Y, Kataura A. The prognostic value of Ki-67 antigen in non-Hodgkin's lymphoma of Waldeyer ring and the nasal cavity. *Cancer* 1992; 70: 2342-2349.
151. Tominaga K, Yamaguchi Y, Nozawa Y, et al. Proliferation in non-Hodgkin's lymphomas as determined by immunohistochemical double staining for Ki-67. *Hematol Oncol* 1992; 10: 163-169.

- 152.** Winter JN, Andersen J, Variakojis D, et al. Prognostic implications of ploidy and proliferative activity in the diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1996 Nov 15; 88(10): 3919-3925.
- 153.** El-Bolkainy TN, El-Bolkainy MN, Khaled HM, et al. Evaluation of MIB-1 and P53 overexpression as risk factors in large cell non-Hodgkin's lymphoma in aduith. *Egypt Natl Canc Inst* 2007 Dec; 19(4): 231-8.
- 154.** Llanos M, Alvarez-Argüelles H, Aleman R, et al. Prognostic Significance of Ki-67 Nuclear Proliferative Antigen Bcl-2 Protein and P53 Expression in Follicular and Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Medical Oncology* 2001; Vol 18, No.1: 15-22.
- 155.** Jerkeman M, Anderson H, Dictor M, et al. Assessment of biological prognostic factors provides clinically relevant information in patient with diffuse large B-cell lymphoma- a Nordic Lymphoma Group Study. *Ann Hematol* 2004; 83: 414-419.
- 156.** Hans CP, Weisenbueger DD, Greiner TC, et al. Expression of PKC-beta or cyclin-D2 predic for inferior survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 2005; 18: 1377-1384.
- 157.** Uzurov-Dinic V, Savic A, Lazarevic T, et al. Prognostic factors in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Med Pregl* 2009 Mar-Apr; 62 (3-4): 171-6.
- 158.** Pınar Kum. Diffüz büyük B hücreli lenfomalarda Ki-67 ekspresyonunun klinik ve prognostik önemi. Uzmanlık Tezi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri İç Hastalıkları Anabilim Dalı. 2010; 62.
- 159.** Stranks G, Height SE, Mitchell P, et al. Deletions and rearrangement of CDKN2 in lymphoid malignancy. *Blood* 1995; 85: 893-901.
- 160.** Villuendas R, Sanchez-Beato M, Martinez JC, et al. Loss of P16INK4a protein expression in non-Hodgkin's lymphomas is a frequent finding associated with tumor progression. *American Journal of Pathology*. 1998; 153: 887-897.
- 161.** Mateo M, Mollejo M, Villuendas R, et al. Absence of microsatellite instability and low frequency of P53 gene mutation in splenic marginal zone lymphoma. *Mol Pathol* 1998; 51: 262-267.

162. Martinez Delgado B, Fernandez-Piqueras J, Garcia MJ, et al. Hypermethylation of a 5'CpG island of P16 is a frequent in non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 1997; 11: 425-428.
163. Herman JG, Civin CI, Issa JPJ, et al. Distinct patterns of inactivation of P15INK4B and P16INK4A Characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 1997; 57: 837-841.
164. Pinyol M, Cobo F, Bea S, et al. P16INK4A gene inactivation by deletions, mutations and hypermetilation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1998; 91: 1427-1434.
165. Garcia-Sanz R, Montero MV, Diaz MG, et al. Detection of single and associated lesions of the bcl-1, bcl-2, bcl-6, c-myc, P53, and P16 genes in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: value of molecular analysis for a better assignment of the histologic subtype. *Haematologia* 1998; 83: 209-216.
166. Paik JH, Jeon YK, Park SS, et al. Expression and prognostic implications of cell cycle regulatory molecules, P16, P21, P14 and P53 in germinal center and non-germinal centre B-like diffuse large B-cell lymphoma. *Histopathology* 2005; 47: 281-291.
167. Shiozawa E, Takimoto M, Makino R, et al. Hypermethylation of CpG islands in P16 as a prognostic factor for difuse large B-cell lymphoma in a high-risk group. *Leukemia Research* 2006; 30: 859-867.
168. Tsygankov D, Liu Y, Sanoff HK, et al. A quantitative model for age-dependent expression of the P16INK4a tumor suppressor. 2009 Sep 29; 106(39): 16562-7.
169. Sanchez-Beato M, Saez AI, Navas IC, et al. Overall survival in aggressive B-cell lymphomas is dependent on the accumulations in P53, P16 and P27. *Am J Pathol* 2001; 159(1): 205-213.
170. Moller MB, Kania PW, Ino Y, et al. Frequent disruption of the RB Pathway in diffuse large B-cell lymphoma: prognostic significance of E2F-1 and P16INK4A. *Leukemia* 2000; 14(5): 898-904.
171. Serrano J, Goebel SU, Peghini PL, et al. Alterations in the P16INK4A/CKN2A Tumor suppressor gene in Gastrinomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000; 85: 4146-4156.

172. Drexler HG. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4A family genes P15, P16, P18, P19, in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia*. 1998; 12: 845– 859.
173. el-Naggar AK, Lai S, Clayman G, et al. Methylation, a major mechanism of P16/CDKN2 gene inactivation in head and neck squamous carcinoma. *Am J Pathol*. 1997; 151:1767–1774.

EKLER

Ek 1 Bütün klinik parametreler ile Ki-67, P53 ekspresyon sonuçları arasındaki ilişki Sperman's rho korelasyon analizi.

Correlations												
			KI_67_YUZDE	P_53_YUZDE	yas	TAKIP_S	evre	IPI	SEDIM	CRP	LOKOSIT	PERF
Spearman's rho	KI_67_YUZDE	Correlation Coefficient	1.000	-.104	.084	-.133	-.268	-.103	.136	.124	.139	.042
		Sig. (2-tailed)	.	.522	.605	.412	.206	.529	.409	.492	.393	.798
		N	40	40	40	40	24	40	39	33	40	40
	P_53_YUZDE	Correlation Coefficient	-.104	1.000	.017	.022	.000	-.072	.283	.176	.139	.088
		Sig. (2-tailed)	.522	.	.919	.894	.998	.658	.081	.327	.391	.589
		N	40	40	40	40	24	40	39	33	40	40
	yas	Correlation Coefficient	.084	.017	1.000	-.396*	.233	.416**	.249	.098	.228	.012
		Sig. (2-tailed)	.605	.919	.	.011	.272	.008	.127	.588	.156	.941
		N	40	40	40	40	24	40	39	33	40	40
	TAKIP_S	Correlation Coefficient	-.133	.022	-.396*	1.000	-.230	-.353*	-.283	-.080	-.151	.061
		Sig. (2-tailed)	.412	.894	.011	.	.280	.025	.081	.658	.353	.708
		N	40	40	40	40	24	40	39	33	40	40
	evre	Correlation Coefficient	-.268	.000	.233	-.230	1.000	.626**	.150	.417	.027	-.148
		Sig. (2-tailed)	.206	.998	.272	.280	.	.001	.485	.067	.902	.489
		N	24	24	24	24	24	24	24	20	24	24
	IPI	Correlation Coefficient	-.103	-.072	.416**	-.353*	.626**	1.000	.267	.375*	.184	-.081
		Sig. (2-tailed)	.529	.658	.008	.025	.001	.	.101	.032	.256	.620
		N	40	40	40	40	24	40	39	33	40	40
	SEDIM	Correlation Coefficient	.136	.283	.249	-.283	.150	.267	1.000	.364*	.401*	.027
		Sig. (2-tailed)	.409	.081	.127	.081	.485	.101	.	.037	.011	.871
		N	39	39	39	39	24	39	39	33	39	39
	CRP	Correlation Coefficient	.124	.176	.098	-.080	.417	.375*	.364*	1.000	.147	-.193
		Sig. (2-tailed)	.492	.327	.588	.658	.067	.032	.037	.	.413	.281
		N	33	33	33	33	20	33	33	33	33	33
	LOKOSIT	Correlation Coefficient	.139	.139	.228	-.151	.027	.184	.401*	.147	1.000	-.080
		Sig. (2-tailed)	.393	.391	.156	.353	.902	.256	.011	.413	.	.623
		N	40	40	40	40	24	40	39	33	40	40
	PERF	Correlation Coefficient	.042	.088	.012	.061	-.148	-.081	.027	-.193	-.080	1.000
		Sig. (2-tailed)	.798	.589	.941	.708	.489	.620	.871	.281	.623	.
		N	40	40	40	40	24	40	39	33	40	40

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Ek 2 Hastalara Ait Bütün Veriler

İSİM	YAŞ	CİNS	TANI TARİHİ	EVRE	Kİ Tutulumu	EN-TUT	NÜKS	IPI	SEDİM	LDH	CRP	LOKOSIT	TAKİP S	PERF	B SEMP	Kİ-67	P-53	P-16
1	71	E	Şub.10		Yok	Yok		1	13	300	3	3	6	1		%50-75	%1	N
2	87	K	Oca.10			Yok		1	42	197	3	5	16	1		%50-75	%1	N
3	79	E	Kas.06	3		Yok		3	34	425	139	12	12	2	1	%85	%10-50	N
4	74	E	Ara.07					1	87	199	21	14	40	1		%20	%15-20	N
5	74	K	May.10			Yok		2	26	657	3	35	12	1		%50-75	%4-9	N
6	73	E	May.10		Yok	Yok		1	15	216	3	10	12	1		%30	%1-10	N
7	56	E	Nis.10	2				0	28	335		4	10	1	1	%80	%1-10	N
8	54	E	Mar.10		Yok			0	36	267	7	11	14	1		%75-100	%1-10	N
9	65	E	Haz.10		Yok			1	15	180	3	7	10	1		%60	%1-10	15%
10	71	E	May.10		Yok	Yok	Yok	2	47	410	6	2	12	2	2	%50-75	%40	%2
11	36	E	Mar.06	3	Yok		Var	1	11	220	10	4	62	1	2	%10	%1	N
12	56	E	Oca.08	4	Var			2	13	289	5	4	14	2		%40	%1	%
13	75	K	Eki.07		Yok	Var		3	13	488	9	8	1	2		%40	%1	%13
14	58	E	Ağu.07					1		434		8	2	2		%80	%28	%22
15	48	K	Şub.07	2				0	26	229	6	5	50	1	1	%45	%19	N
16	69	E	Ağu.08		Yok			2	19	1028	96	1	8	1		%60	%52	N
17	44	K	Haz.08	3				1	9	318	3	5	32	1		%50-60	%1	%45
18	39	K	Haz.09	1				0	61	274	6	7	22	1		%90	%7	%20
19	64	K	Mar.07	3	Yok			2	54	375	8	7	16	1	1	%30	%70	%34
20	20	K	Şub.08		Yok			0	5	178	14	4	36	1		%50	%1	N
21	54	K	Nis.05	3	Yok			2	87	636	3	5	12	1		%20	%1-10	N
22	66	K	Nis.09	3	Yok	Var		2	158	306	32	16	11	1	1	%70-80	%2	%16
23	63	E	Kas.05		Yok			1	74	304	4	23	6	1		%25-30	%30	%22
24	71	K	Eyl.10		Yok	Yok		1	42	202		10	7	1		%50-60	%1-10	%30
25	41	E	Şub.10	3	Yok	Var		2	49	224	26	6	14	2	2	%85	%1	N
26	78	E	Eki.10		Yok	Var	Var	2	45	354		9	6	1		%75-100	%1	N
27	55	K	Mar.10	2	Yok	Yok		0	13	424	7	5	13	1	2	%90	%1	N
28	57	E	Şub.05	3		Yok	Yok	3	5	750		3	27	2	1	%50	%1	N
2	75	K	Eki.10	4	Var	Var	Yok	3	23	267	37	10	6	0	1	%80	%1-10	N
30	84	E	Ara.05	2				1	13	409	15	4	24	1	1	%30	%1-10	N
31	38	E	Ara.05	2	Yok	Var	Var	1	8	429	3	4	10	2		%10	%10	N
32	52	E	Ags.08	3				1	53	308	15	4	32	1	1	%80	%80	N
33	80	K	Ara.07	2			Yok	3	17	635	3	12	34	3		%80	%1	N
34	83	E	Ags.08	4				3	92	465		3	1	1		%50	%1	%2
35	57	K	Ara.09	1	Yok	Yok	Var	2	78	681		6	9	2	2	%80	%1	N
36	81	K	Eyl.07		Yok			2	97	524	174	11	1	1		%75	%1	N
37	66	K	Kas.08	3	Yok			2	28	207	13	7	28	1		%60	%10-50	N
38	50	E	May.05	4		Var		2	19	180	9	10	11	2		%60	%1-10	N
39	26	E	Ara.08	1	Yok	Yok	Yok	0	3	223	3	5	28	0		%80	%1	%20
40	30	E	Nis.10	3	Yok	Var	Yok	2	65	1195	60	12	12	0		%20	%3	%30

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Münevver BARAN

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 2 Şubat 1979, Kayseri

Medeni Durumu: Evli

Tel: 0 535 335 84 41

email: b.munevver@hotmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi-Biyoloji Anabilim Dalı 38039
Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2004
Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji	2000
Lise	Şeker Lisesi, Kayseri	1996

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2004- Halen	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı	Biyolog

YABANCI DİL

İngilizce