

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

ÇOCUK VE ADOLESAN LENFOMALARININ
ETYOPATOGENEZİNDE TÜMÖR BASKILAYICI GENLERDE DNA
METİLASYONUNUN ROLÜ

UZMANLIK TEZİ

Dr. İHSAN ÖZDEMİR

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. F. GÜÇLÜ PINARLI

ANKARA 2017

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**ÇOCUK VE ADOLESAN LENFOMALARININ
ETYOPATOGENEZİNDE TÜMÖR BASKILAYICI GENLERDE DNA
METİLASYONUNUN ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. İHSAN ÖZDEMİR

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. F. GÜÇLÜ PINARLI**

ANKARA 2017

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimime başladığım ilk günden eğitimimin son gününe kadar iyi bir çocuk hekimi olabilmem için bilgilerini ve emeklerini esirgemeyen başta Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Aysun Bideci olmak üzere tüm değerli hocalarıma,

Eğitim aldığım sürede ve tez çalışmam sırasında bilgi, emek ve deneyimlerini her zaman paylaşan, insani, ahlaki değerleri ve disiplini ile örnek aldığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. F. Güçlü Pınarlı'ya,

Tez çalışmam sırasında genetik analizlerin titizlikle yapılması ve yorumlanmasında fedakarlıklarını esirgemeyen Sayın Uzm. Dr. Ferda Alpaslan Pınarlı ve laboratuvar ekibine,

Tez çalışmam sırasında patoloji preparatlarının hazırlanmasında emekleri olan Sayın Doç. Dr. Pınar Aylin Göçün ve laboratuvar ekibine,

Tez çalışmamın bulgularının yorumlanmasında, istatistiksel verilerin oluşmasında emeği geçen Sayın Prof. Dr. F. Nur Baran Aksakal'a

Tez çalışmam sırasında büyük yardımlarını gördüğüm Sayın Yard. Doç. Dr. Arzu Okur'a

Uzmanlık eğitimimi birlikte geçirdiğim uzman ve asistan arkadaşlarıma, ayrıca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen dostum Uzm. Dr. Metehan Kızılkaya'ya

Beni bugünlere getiren canım anneme ve babama,

Her zaman bir olduğumuz kardeşlerim Abdullah ve Ahmet'e

Desteklerini her zaman bildiğim, en zor ve en güzel günleri birlikte paylaştığım, anlayışını, sevgisini esirgemeyen can yoldaşım eşim Dr. Hatice Kübra Özdemir'e

Sonsuz teşekkürler.

Dr. İhsan ÖZDEMİR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. HODGKİN LENFOMA	9
2.1.1. Hodgkin Lenfomanın Tarihçesi ve Sınıflama	9
2.1.1.1. Klasik Hodgkin Lenfoma (KHL)	10
2.1.1.1.1. Lenfositten Zengin Tip (Lymphocyte Rich-LR)	11
2.1.1.1.2. Lenfositten Fakir Tip (Lymphocyte Depleted-LD)	12
2.1.1.1.3. Karışık Hücreli Tip (Mixed Cellularity-MC)	12
2.1.1.1.4. Nodüler sklerozan Tip (Nodular Sclerosis-NS)	12
2.1.1.2. Nodüler, Lenfositten Baskın Hodgkin Lenfoma (Nodular Lymphocyte-Predominant Hodgkin's Lymphoma-NLPHL)	13
2.1.2. Hodgkin Lenfoma'da Epidemiyoloji ve Etiyolojik Faktörler	13
2.1.3. Hodgkin Lenfomanın Klinik Bulguları ve Laboratuvar Özellikleri	15
2.1.4. Hodgkin Lenfomanın Tanısı ve Evrelendirilmesi	18
2.1.5. Hodgkin Lenfomanın Tedavisi	21

2.2. HODGKİN DIŞI LENFOMA.....	23
2.2.1. Hodgkin Dışı Lenfomanın Tarihçesi	23
2.2.2. Hodgkin Dışı Lenfomada Histopatoloji ve Sınıflama	24
2.2.3. Hodgkin Dışı Lenfomada Epidemiyoloji ve Etiyolojik Faktörler	27
2.2.4. Hodgkin Dışı Lenfomanın Kliniği ve Labaratuvar Özellikleri.....	29
2.2.5. Hodgkin Dışı Lenfomanın Tanısı ve Evrelendirilmesi	32
2.2.6. Hodgkin Dışı Lenfomanın Tedavisi	35
2.2.7. Hodgkin Dışı Lenfomada Prognoz	41
2.3. KANSER.....	42
2.3.1. Tümör Gelişimi	46
2.3.1.1. Onkogenler (proto-onkogenler)	46
2.3.1.2. Tümör Süpresör Genler (TSG).....	47
2.3.1.2.1. Hücre Yüzeyinde Etkili Olan Tümör Süpresör Genler	48
2.3.1.2.2. Uyarı İletim Sistemini Düzenleyen Tümör Süpresör Genler	48
2.3.1.2.3. Çekirdekte Etkili Olan Tümör Süpresör Genler	49
2.3.1.3. Heterozigosite Kaybı (Loss of Heterozygosity-LOH)	52
2.3.1.4. Hatalı Eşleşme Onarım Genleri (Mismatch Repair genleri- MMR).....	52
2.3.1.5. Telomeraz Aktivitesi.....	53
2.3.1.6. Epigenetik Değişimler	54
2.4. KANSER VE GENETİK	57
2.4.1. Epigenetik Mekanizmalar	60
2.4.1.1. Histon Modifikasyonları	60
2.4.1.2. DNA Metilasyonu	61

2.4.1.3. RNA ile İndüklenen Sessizleşme (RNA-induced silencing)	69
2.4.2. Epigenetik Tedavi	69
2.4.3. Metilasyon Yoluyla Etkisizleşerek Çocukluk Çağı Lenfomalarının Etiyopatogenezinde Rol Oynadığı Öne Sürülen Tümör Baskılayıcı Genler	70
2.4.3.1. <i>CDKN2A</i>	70
2.4.3.2. <i>PU1 (SPI1)</i>	71
2.4.3.3. <i>PRDX2</i>	71
2.4.3.4. <i>DLEC1</i>	71
2.4.3.5. <i>FOXO1</i>	72
2.4.3.6. <i>KLF4</i>	72
2.4.3.7. <i>DAPK1</i>	73
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	74
3.1. HASTA VE KONTROL GRUPLARININ SEÇİMİ.....	74
3.2. OLGULARIN İZLEMİ.....	75
3.3. ETİK KURUL ONAYI	75
3.4. ARAŞTIRMA PROJESİ DESTEĞİ.....	76
3.5. ÇALIŞMA PLANI VE YÖNTEMLERİ	76
3.5.1. DNA ve RNA İzolasyonu	76
3.5.2. İzole Edilen DNA ve RNA ların Kontrolü	76
3.5.3. İzole Edilen RNA'nın cDNA'ya Çevrilmesi	77
3.5.4. Gen Ekspresyon (RT- qPCR) Çalışması.....	77
3.5.5. Metilasyon Spesifik PCR Çalışması.....	79
4. BULGULAR	82
5. TARTIŞMA.....	108
6. SONUÇLAR.....	123
7. ÖZET	125
8. SUMMARY.....	126
9. KAYNAKLAR	127

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 2.1.	Reed-Sternberg Hücresi	10
Şekil 2.2.	Hücre Siklusu	50
Şekil 2.3.	Epigenetik mekanizmaların kanser gelişimindeki rolü	57
Şekil 2.4.	Epigenetik mekanizmalar	58
Şekil 2.5.	Başlıca epigenetik mekanizmalar	59
Şekil 2.6.	CpG metilasyon mekanizması	62
Şekil 2.7.	Normal ve kanserli hücrelerin DNA metilasyonu ile ilişkisi.	66
Şekil 2.8.	Normal DNA metilasyonu ve gen ifadelenmesi	68
Şekil 3.1.	Gen ekspresyon çalışmasının Real Time PCR cihazındaki verilerinin grafiği	78
Şekil 3.2.	Metilasyon spesifik PCR çalışmasının Real Time PCR cihazındaki verilerinin grafiği	80
Şekil 4.3.	Hodgkin lenfoma hastalarının genel yaşam analizi	86
Şekil 4.4.	Hodgkin lenfoma hastalarını olaysız yaşam analizi	86
Şekil 4.5.	Hodgkin lenfoma hastalarının evrelere göre genel yaşam analizi	87
Şekil 4.6.	Hodgkin lenfoma hastalarının evrelere göre olaysız yaşam analizi	87
Şekil 4.7.	Non- Hodgkin lenfoma hastalarının genel yaşam analizi	88
Şekil 4.8.	Non- Hodgkin lenfoma hastalarının olaysız yaşam analizi	88
Şekil 4.9.	Non- Hodgkin lenfoma hastalarının evrelere göre genel yaşam analizi	89
Şekil 4.10.	Non- Hodgkin lenfoma hastalarının evrelere göre olaysız yaşam analizi	89
Şekil 5.1.	B hücre maliynitelerinin oluşum mekanizması	108

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 2.1.	Çocukluk Çağı Lösemi Dışı Kanserlerin Tümör Tiplerine Göre Dağılımı (TPOG 2002).....	4
Tablo 2.2.	TPOG/TPHD Pediatrik Kanser Kayıtları, 2009	5
Tablo 2.3.	Maliyın Lenfoma Klasifikasyon Sistemleri	7
Tablo 2.4.	Çocukluk Çağı ve Erişkin HL'lerin 2016 WHO Sınıflaması.....	8
Tablo 2.5.	WHO 2016 Sınıflamasında Yer Alan Çocukluk Çağı HDL Alt Grupları	8
Tablo 2.6.	HL'de İmmünohistokimyasal Bulgular	11
Tablo 2.7.	HL'de klinik ve patolojik özelliklerin tümör hücrelerinden salınan sitokinlerle ilişkisi	17
Tablo 2.8.	Klinik evrelerin belirlenebilmesi için yapılması gereken incelemeler	18
Tablo 2.9.	HL'de Ann Arbor sınıflamasında Costwold Modifikasyonu.....	20
Tablo 2.12.	HDL'li hastanın değerlendirilmesi.....	33
Tablo 2.13.	St. Jude evreleme sistemi.....	34
Tablo 2.14.	Tümör lizis sendromuna yaklaşım.....	36
Tablo 2.15.	B Hücreli NHL-BFM 95 Tedavi Protokolü	38
Tablo 2.16.	B Hücreli HDL İçin Risk Sınıflaması (SFOP).....	39
Tablo 2.17.	B-Hücreli NHL-BFM 95 Protokolü Risk Grupları.....	40
Tablo 2.18.	Kanserin Genetik Yapısı	45
Tablo 3.1.	Gen Ekspresyon Çalışmasında Çalışılacak Genlere ait Primerler ve Katalog Bilgileri	78
Tablo 3.2.	Metilasyon Spesifik PCR için Seçilen Genlerin Promoter Bölgeleri için Dizayn Edilen Primerler	80

Tablo 4.1.	Hasta ve kontrol grubunun yaş, cinsiyet, evre (HL, NHL), primer lokalizasyon ve tanı alt grupları.....	82
Tablo 4.2.	HL ve NHL hastalarının tutulum bölgeleri.....	83
Tablo 4.3.	Ekspresyon çalışılan hasta gruplarının dağılımı.....	90
Tablo 4.4.	Gruplar içerisinde <i>CDKN2A</i> geni için bakılan ekspresyon durumu	91
Tablo 4.5.	Gruplar içerisinde <i>SPI1</i> geni için bakılan ekspresyon durumu	92
Tablo 4.6.	Gruplar içerisinde <i>PRDX2</i> geni için bakılan ekspresyon durumu	93
Tablo 4.7.	Gruplar içerisinde <i>DLEC1</i> geni için bakılan ekspresyon durumu	94
Tablo 4.9.	Gruplar içerisinde <i>KLF4</i> geni için bakılan ekspresyon durumu	96
Tablo 4.10.	Gruplar içerisinde <i>DAPK1</i> geni için bakılan ekspresyon durumu	97
Tablo 4.11.	Hasta grupları içerisinde metilasyon çalışılma durumu	98
Tablo 4.12.	Metilasyon çalışılan hasta gruplarının dağılımı	99
Tablo 4.13.	Hasta ve kontrol grupları içerisinde <i>CDKN2A</i> geni için bakılan metilasyon durumu.....	100
Tablo 4.14.	Hasta ve kontrol grupları içerisinde <i>SPI1</i> geni için bakılan metilasyon durumu	101
Tablo 4.15.	Hasta ve kontrol grupları içerisinde <i>PRDX2</i> geni için bakılan metilasyon durumu	102
Tablo 4.16.	Hasta ve kontrol grupları içerisinde <i>DLEC1</i> geni için bakılan metilasyon durumu	103
Tablo 4.17.	Hasta ve kontrol grupları içerisinde <i>FOXO1</i> geni için bakılan metilasyon durumu	104

Tablo 4.18. Hasta ve kontrol grupları içerisinde <i>KLF4</i> geni için bakılan metilasyon durumu	105
Tablo 4.19. Hasta ve kontrol grupları içerisinde <i>DAPK1</i> geni için bakılan metilasyon durumu	106



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çocukluk çağı lenfomaların yaklaşık %40'ını Hodgkin, %60'ını ise Hodgkin dışı lenfomalar oluşturmaktadır. Hodgkin ve Hodgkin dışı lenfomaların prognozu birçok çocukluk çağı kanserine göre iyi olmasına karşın, refrakter ve progresif olgularda yaşam oranları düşüktür.

Son yıllarda diğer kanser tiplerinde olduğu gibi, lenfomaların etiyopatogenezinde de epigenetik bozuklukların rol oynadığı ileri sürülmüştür; bunların en önemlileri gen sessizleşmesine neden olan DNA metilasyonu ve histon modifikasyonudur. Özellikle tümör baskılayıcı genlerin ya da damgalanmaya uğrayan genlerin promoter bölgelerindeki hipermetilasyon, ilgili genin normalden farklı ifade bulmasına yol açar ve kanser oluşumuna katkıda bulunur. Lenfoid malignitelerdeki DNA onarımı, apoptozis ve hücre siklusunu düzenleyen genlerin metilasyona uğrayarak kansere yol açtığı bildirilmektedir.

Çocuk ve adolesan lenfomalarında *CDKN2A*, *PU.1 (SPI1)*, *PRDX2*, *DLEC1*, *FOXO1*, *KLF4*, *DAPK1* genlerinin metilasyon yolu ile epigenetik sessizleşmesi etiyopatogenezde rol almaktadır. Ülkemizde çocukluk çağı lenfomalarında epigenetik özellikler ve spesifik olarak tümör baskılayıcı genlerin metilasyonu üzerine yapılmış çalışma yoktur.

Çalışmamızda Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı'nda 2000-2015 yılları arasında takip ve tedavi edilen Hodgkin ve Hodgkin dışı lenfoma tanılı hastaların tümör örneklerinde *CDKN2A*, *PU.1*

(*SPI1*), *PRDX2*, *DLEC1*, *FOXO1*, *KLF4*, *DAPK1* genlerinin metilasyon yolu ile epigenetik sessizleşmesi araştırılacaktır.

Çalışmamızın amacı ise çocukluk çağı lenfomalarının gelişiminde belirli gen ve yolakların rolünün araştırılması ve moleküler genetik veriler ile hastaların klinik özellikleri ve yaşam analizleri karşılaştırılarak prognostik faktörler ve risk gruplarının belirlenmesidir. Elde edilecek sonuçlar belirlenen molekül ve yolaklara yönelik hedef tedavilerin geliştirilmesine temel oluşturabilecek, prognoz ve risk gruplarına göre yoğunluğu adapte edilmiş tedavi planlanması açısından literatüre katkıda bulunabilecektir. Lenfoma etyopatogenezinde hipermetilasyon yoluyla sessizleşen kritik tümör baskılayıcı genlerin saptanması, demetile edici ajanların hedef tedavi olarak kullanılabilmesinin yolunu açacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Normal lenfoid sistem işlevsel olarak bölümlere ayrılır (1). Merkezi lenfoid sistem (kemik iliği ve timus) immatür lenfositlerin fonksiyonel, immüno-komponent T ve B hücrelerine dönüşümlerinden sorumludur. Lenfoid farklılaşmada rol alan hücreler kemik iliğinde multipotent kök hücreden köken alır. T hücreleri timusta ileri evrelere farklılaşır, B hücreleri ise olgunlaşmalarına kemik iliğinde devam eder. İmmünglobulin ve T hücre reseptör genleri kullanılarak geliştirilen mekanizmalar, öncül T ve B hücre maturasyonunda temel biyolojik basamaklardır. Yüzey reseptörlerin ekspresyonu ile lenfoid hücreler antijene yanıt vermeye hazır hale gelir. Periferik lenfoid sistem (dalak, lenf nodları, barsak ve solunum yollarındaki lenfoid dokular, deri) merkezi lenfoid organlarda programlanmış olan lenfosit topluluğunu içerir ve antijenik uyarı sonrası immün yanıt oluşturmaya hazırdır. Maliyn dönüşüm, morfolojik ve fonksiyonel olarak bağışıklık sistemindeki lenfoid popülasyondan ve merkezi-periferik lenfoid organlardan kaynaklanır. Çocukluk çağında maliyn lenfomaların %80'i B hücre kaynaklıdır (2).

Gelişmiş ülkelerde maliyn lenfomalar (Hodgkin lenfoma ve Hodgkin dışı lenfoma), çocukluk çağı maliyiniteleri arasında lösemi ve beyin tümörlerinden sonra 3. sırayı alır (3). Bizim ülkemizde ise lenfomalar, lösemilerden sonra 2. sırada yer almakta, 15 yaş altı çocuklarda tüm kanserlerin %10-12'sini, 20 yaş altı adölesanlarda ise %15'ini oluşturmaktadır. Türk pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) 2002 ulusal

çocukluk çağı kanser kayıtlarına göre ülkemizde solid tümörler içinde %26.8 oranı ile lenfomalar ilk sırayı almaktadır (Tablo 2.1) (4). TPOG ve Türk Pediyatrik Hematoloji Derneği 2009 yılı ulusal çocukluk çağı kanser kayıtlarına göre tüm tümör tipleri içerisinde %19.72 ile lösemilerden sonra ikinci sırada yer almaktadır (Tablo 2.2) (5).

Tablo 2.1. Çocukluk Çağı Lösemi Dışı Kanserlerin Tümör Tiplerine Göre Dağılımı (TPOG 2002) (4)

Tümör tipi	Erkek/Kız	Sayı	%
Lenfoma	195/92	287	26.80
HDL	124/57	181	16.90
Hodgkin	71/35	106	9.90
Histiyoitozis	1/0	1	0.10
MSS tümörleri	134/93	227	21.10
Sempatik sinir sistemi tümörleri	49/52	101	9.40
Yumuşak doku tümörleri	46/35	81	7.50
Böbrek tümörleri	35/41	76	7.10
Osteosarkom	37/23	60	5.60
Ewing tümörü	27/18	45	4.20
Kondrosarkom	1/0	1	0.10
Retinoblastom	18/31	49	4.60
Germ hücreli tümörler	34/31	65	6.10
Karaciğer	18/5	23	2.10
Karsinoma/Diğer	29/28	57	5.30
Toplam	624/449	1073	100.00

Tablo 2.2. TPOG/TPHD Pediatrik Kanser Kayıtları, 2009 (5)

Tümör tipi	Sayı	%
Lösemi	1769	23.05
Lenfoma/RES	1513	19.72
MSS tümörleri/intrakraniyal/intraspinal	1129	14.71
Sempatik Sinir Sistemi Tümörleri	593	7.79
Retinoblastom	297	3.8
Böbrek tümörleri	463	6.0
Karaciğer	114	1.5
Maliyn kemik tümörleri	460	6.0
Yumuşak doku sarkomları	499	6.5
Germ hücreli/trofoblastik/diğer gonadal	365	4.7
Karsinom/Diğer maliyn epitelyal	231	3.1
Diğer/non-spesifiye maliyn LCH	240	3.1
Toplam	7673	100.0

Histopatolojik sınıflamasında hala tartışmalar olan maliyn lenfomalar için 1966 yılından şimdiye kadar çeşitli klasifikasyonlar kullanılmıştır (Tablo 2.3). Bu sınıflamaların tümünde ortak parametre klinikopatolojik farklılıklardır. Rappaport klasifikasyonu (6) temel olarak infiltrasyon paterni ve hücrelerin sitolojik özelliklerine dayalı olmasına karşın Lukes-Collins (7) ve Kiel klasifikasyonları (8) temelde histopatolojik ve sitolojiye dayanan T ve B fenotiplemesine göre modifiye edilmiş

sınıflamalardır. 1982’de lenfoma klasifikasyonunda terminolojide ortak bir dil arayışı nedeniyle histopatolojik ve sitolojik özelliklere dayalı değişik kategorilerin ortak ve ayırıcı özellikleri göz önüne alınmadan sadece sıralamaya dayanan Working Formulation (9) kullanılmaya başlanılmıştır. Uluslararası lenfoma çalışma grubu tarafından 1994 ‘den itibaren önerilen ve temeli Kiel klasifikasyonuna dayanan REAL sınıflaması (10) moleküler genetik, sitogenetik, immunoloji, klinik ve prognostik bilgilerin tümünü içermektedir. Bu sınıflamada lenfoid lösemiler, plazma hücreli neoplaziler, ektranodal lenfomalar ile ilk kez bu sınıflamada yer alan lenfomalar aynı hücre dizisinin neoplastik hastalıkları olarak hep birlikte bulunmaktadır. İlerleyen yıllarda bu sınıflamada grade sisteminin olmaması ve farklı antitelerin aynı sınıflamada olması nedeniyle eleştiriler alması ile Dünya Sağlık Örgütü (WHO) (11) temeli REAL sınıflamasına dayalı WHO 2008 sınıflamasını yayınlamıştır. Mart 2016 da ise WHO; bugün kullanılan lenfoid neoplaziler sınıflamasını hedef tedavi stratejilerine fırsat tanıyacak olan moleküler ve genetik tanı yöntemlerinin de son yıllardaki büyük katkıları ile revize ederek yayınlamıştır. Sınıflamaya bakılacak olduğunda erişkin lenfomalarında alt grup sayısı artmışken, çocukluk çağı lenfomalarında çok belirgin bir değişiklik göze çarpmamaktadır (11a).

Tablo 2.3. Maliyn Lenfoma Klasifikasyon Sistemleri

Maliyn lenfoma klasifikasyon sistemleri
. Rappaport klasifikasyonu (1964)
. Lukes-Collins klasifikasyonu (1974)
. Kiel-Lennert klasifikasyonu (1974)
. Working Formulation (1982)
. REAL (Revised European-American
. Classification of Lymphoid Neoplasms (1994)
. WHO klasifikasyonu (1998)
. WHO klasifikasyonu (2008)
. WHO klasifikasyonu (2016)

Çocukluk çağı lenfomaları, biyolojik davranışları ve tedavileri birbirinden farklı Hodgkin Lenfoma (HL) (%40) ve Hodgkin Dışı Lenfoma (HDL) (%60) olmak üzere 2 alt gruba ayrılır. WHO sınıflamasında görülen antitelerden çocukluk çağında en sık görülen lenfoma tipleri tabloda belirtilmiştir (Tablo 2.4-5).

Tablo 2.4. Çocukluk Çağı ve Erişkin HL'lerin 2016 WHO Sınıflaması (11a)

1. Klasik Hodgkin Lenfoma (KHL) a) Lenfositten zengin (Lymphocyte Rich-LR) b) Nodüler sklerozan (Nodular Sclerosis-NS) c) Karışık hücreli (Mixed Cellularity-MC)
2. Nodüler Lenfosit Predominant Hodgkin Lenfoma (NLPHL)

Tablo 2.5. WHO 2016 Sınıflamasında Yer Alan Çocukluk Çağı HDL Alt Grupları (11a) (34)

HDL Alt Grupları	Sıklık (%)
Prekürsör Lenfoid Neoplaziler ○ T Lenfoblastik lenfoma ○ B Lenfoblastik lenfoma	15-20 3
Matür B Hücreli Neoplaziler ○ Burkitt lenfoma ○ Yaygın büyük B hücreli lenfoma ○ Primer mediastinal B hücreli lenfoma ○ Pediatrik folliküler lenfoma ○ Pediatrik marjinal zon lenfoma	35-40 15-20 1-2 Nadir Nadir
Matür T Hücreli Neoplaziler ○ Anaplastik büyük hücreli lenfoma, Anaplastik lenfoma kinaz (ALK) (+) ○ Periferik T hücreli lenfoma (başka türlü sınıflandırılmayan)	15-20 Nadir

Son yıllarda özellikle histopatoloji, immünoloji, sitogenetik-epigenetik ve moleküler biyolojideki ilerlemeler nedeniyle, çocukluk çağı lenfomalarındaki bilgilerimiz de giderek artmıştır. Buna bağlı olarak da çocukluk çağı lenfomalarının tedavisi de dramatik olarak gelişmiş ve çoğu hastada tamamen kür sağlanabilir hale gelmiştir.

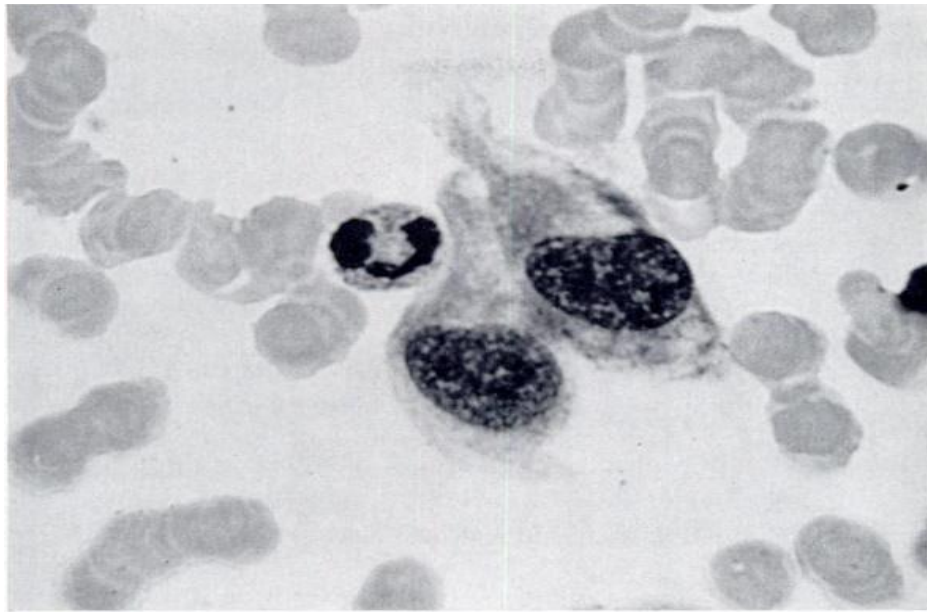
2.1. HODGKİN LENFOMA

2.1.1. Hodgkin Lenfomanın Tarihçesi ve Sınıflama

Hodgkin hastalığı, ilk kez 1832 yılında Thomas Hodgkin tarafından, lenf bezleri ve dalağın büyümesi ile karakterize bir hastalık olarak tanımlanmış ve 1865 yılında Sir Samuel Wilks tarafından isimlendirilmiştir (12-13). 1898 yılında Sternberg ve 1902 yılında da Reed tarafından hastalığa özgü binükleer veya multinükleer dev hücreler tanımlanmıştır (14-15). Hastalığın maliyn kaynaklı olması da Seif ve Springs tarafından sitogenetik analiz ile maliyn hücrelerin klonal orjininin gösterilmesi ile kanıtlanmıştır (16). Çoğu vakada maliyn hücrelerin B lenfosit kaynaklı olması nedeniyle Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Hematolojik ve Lenfoid Doku Tümör Sınıflaması hastalığın adını Hodgkin Lenfoma (HL) olarak değiştirmiştir (2-11). Ayrıca HL'nin klinik ve biyolojik özellik olarak Klasik Hodgkin Lenfoma (KHL) ve Nodüler Lenfosit Predominant Hodgkin Lenfoma (NLPHL) olmak üzere iki farklı hastalıktan oluştuğu gösterilmiştir. KHL da kendi arasında lenfositten zengin, nodüler sklerozan, karışık hücreli ve lenfositten fakir olmak üzere dört tipe ayrılmıştır (Tablo 2.4).

2.1.1.1.Klasik Hodgkin Lenfoma (KHL)

KHL, küçük lenfositler, eozinofiller, nötrofiller, histiyositler, plazma hücreleri, fibroblastlar ve kollojen fibrillerden oluşan karışık bir zeminde mononükleer Hodgkin hücreleri ile multinükleer Reed Sternberg (RS) hücrelerini içeren bir monoklonal lenfoid neoplazidir (11). Reed-Sternberg hücreleri, büyük, bazofilik stoplazmalı, en az iki nükleer lobdan oluşan ve eozinofilik nükleolus içeren hücrelerdir (Şekil 2.1). Mononükleer varyantları Hodgkin hücreleri olarak tanımlanır ve daha büyük sitoplazma içerir. Reed-Sternberg hücrelerinin büyük bir çoğunluğu B hücre kökenli olup çok az bir kısmı T hücre kökenlidir (17). KHL'de RS hücreleri değişen oranlarda B hücre antijenlerinden olan CD20 ve CD79a antijenlerini taşıırken, vakaların %90'ında B hücre spesifik aktivatör proteini (*BSAP-PAX5* gen ürünü) eksprese edilir (18). RS hücreleri hemen her zaman CD30 antijeni pozitifdir ve genellikle CD15 antijeni eksprese ederler.



Şekil 2.1. Reed-Sternberg Hücresi (Periferik yaymada X1225 büyütme) (19)

Tablo 2.6. HL'de İmmünohistokimyasal Bulgular

Marker	KHL	NLPHL
CD30	+	-
CD15	±	-
CD45	-	+
CD20	±	+
CD79a	±	+
BSAP	±	+
EBV	±	-

*BSAP; B hücre spesifik aktivator proteini, CD; cluster of differentiation, EBV; Epstein-Barr virüs

WHO sınıflamasına göre 4 alt gruba ayrılan KHL'de Reed-Stenberg hücrelerinin immünofenotipik ve genetik özellikleri tüm histolojik alt tiplerde aynıdır ancak alt tiplerin klinik özellikleri ve EBV ile ilişkileri farklıdır. (20).

2.1.1.1.1. Lenfosit Zengin Tip (Lymphocyte Rich-LR)

Tüm olguların yaklaşık %6'sını oluşturur. Diffüz bazen nodüler, matür lenfosit ve değişken sayıda beniyin histiyosit infiltrasyonu ile karakterizedir. Bu tipte RS hücrelerini bulmak son derece güçtür. Eozinofiller, nötrofiller ve plazma hücreleri gibi diğer hücreler de az sayıdadır veya yoktur. Nekroz ve fibrozis nadirdir. Hastaların çoğu 35 yaşın altında ve erkektir. Hastalık sınırlı olup prognozu çok iyidir (26).

2.1.1.1.2. Lenfositten Fakir Tip (Lymphocyte Depleted-LD)

Nadir görülen bir tiptir. Lenfositler az sayıdadır, RS hücreleri ve RS hücrelerinin varyantları göreceli olarak çoktur. Diffüz fibrozis ve retiküler varyantlar olmak üzere iki morfolojik formu vardır. Peripheral T hücreli lenfoma ve anaplastik dev hücreli lenfomadan ayırt etmek zordur. Olguların çoğu ileri yaş erkeklerdir ve sistemik bulgularla birlikte yaygın hastalık vardır. HL'nin en agresif formudur. (26)

2.1.1.1.3. Karışık Hücreli Tip (Mixed Cellularity-MC)

Lenfositten zengin tip ile lenfositten fakir tip arasında olan intermediyer tiptir. Tipik RS hücreleri çok sayıdadır ama lenfositler LR tipine göre daha azdır. Lenf nodu çoğu kez diffüz tutulmuştur. Karışık hücreli tip KHL erkeklerde fazladır, bütün klinik evrelerle birlikte görünebilirse de, hastalık olguların çoğunda yaygındır ve sık olarak sistemik bulgularla birlikte (26).

2.1.1.1.4. Nodüler sklerozan Tip (Nodular Sclerosis-NS)

Gelişmiş ülkelerde en fazla görülen tiptir. Klinik ve histolojik olarak diğer üç formdan farklıdır. Morfolojik olarak iki özellik ile karakterizedir: Birincisi, RS hücrelerinin özel bir varyantı olan laküner hücrelerin bulunması; ikincisi dokuyu nodüllere bölen kollajen bantlarının saptanmasıdır. Klasik RS hücreleri nadirdir. Kadınlarda en sık görülen tiptir ve aşağı servikal, supraklavikular ve mediastinal lenf nodları tutulumu

tipik özelliklerindendir. Olguların çoğu adolesan ve genç erişkindir (26), (21).

2.1.1.2. Nodüler, Lenfositten Baskın Hodgkin Lenfoma (Nodular Lymphocyte-Predominant Hodgkin's Lymphoma-NLPHL)

NLPHL, monoklonal B hücreli neoplazidir. Tüm HL'lerin %10'unu kapsar. Çocuklara oranla erişkinlerde ve erkeklerde daha sıktır. Diğer tiplere kıyasla oldukça iyi bir prognoza sahiptir ancak geç relaplara daha sık rastlanır. Bu olgularda B hücreli lenfomaya dönüşüm veya B hücreli lenfoma ile birliktelik dikkat çekicidir. Diffüz alanların da bulunabileceği nodüler paterne sahiptir. Neoplastik hücreler lenfosit predominant (LP) ya da "popcorn" hücreleri olarak adlandırılan B lenfosit kökenli hücrelerdir. Klasik RS hücreleri yoktur. Neoplastik hücreler immünofenotipik olarak CD19, CD45, CD20, CD22, CD79a pozitif olup CD30 ve CD15 negatiftir (Tablo 2.6). Latent EBV enfeksiyonu LP hücrelerinde hemen hiç görülmez, EBV'nin transformasyonda rolü yoktur (22).

2.1.2. Hodgkin Lenfoma'da Epidemiyoloji ve Etiyolojik Faktörler

Kanser insidans çalışmalarında Avrupa, Amerika, İspanyol ve Avustralya popülasyonunda HL 15-34 yaş arası ve 60 yaş sonrası olmak üzere bimodal dağılım gösterir. Asya popülasyonunda ise insidans daha küçük yaşlara kaymıştır ve yaşla birlikte artış gösterir (23). Hastalık insidansı 10 yaş altında düşüktür, tüm bölgelerde 3 yaşın altında nadir

olarak görülmekte ve 20 yaş altı tüm çocukluk çağı kanserlerin %8.8'ini oluşturmaktadır (24). Hastaların ikiz teklerinde ve birinci derece akrabalarında HL insidansı artmıştır (25). HL'nin çocukluk çağı formu erkeklerde kızlardan 3 kat fazla görülürken, 10 yaş sonrasında insidans artar ve kız-erkek oranı eşitlenir (26). 10 yaş altı pediyatrik popülasyonda karışık hücreli alt tip sık görülürken, adolesan grupta ise nodüler sklerozan tip sık görülür (27). Nodüler sklerozan tip kız-erkek oranı hemen her zaman eşittir (28). Ülkemizin de içinde bulunduğu gelişmekte olan ülkelerde karışık hücreli tipin daha baskın olduğu bilinmektedir.

HL'nin etyolojisi bilinmemektedir. Ancak etyolojisinde rol alan risk faktörleri immun yetersizlikler, enfeksiyöz faktörler ve genetik yatkınlık olarak 3 grupta toplanabilir:

Enfeksiyöz Faktörler: Epstein Barr Virüs (EBV)'nin HL ile birlikteliği birçok epidemiyolojik ve serolojik çalışmalarda gösterilmiştir (26). EBV ile enfekte RS hücreleri ve varyantları Latent Membran Protein 1 (LMP1), Latent Membran Protein 2A (LMP2A), Epstein Barr Nükleer Antijen-1 (EBNA-1) salgırlar (29). LMP1, *bcl 2* ekspresyonunu artırarak B hücrelerini apoptotik hücre ölümünden korumaktadır.

İmmünite: Hodgkin Lenfoma'lı hastalarda yüksek oranda immünolojik bozukluklar görülmektedir. Primer immun yetmezliği olanlarda lenfoma gelişme riski fazladır. Ayrıca, böbrek ve kalp transplantasyonu yapılarak immünsupresif tedavi verilen hastalarda ve AIDS dahil çeşitli kazanılmış immune yetmezliği olan bireylerde HL'yi de içeren maliyn lenfoma gelişim riski artmıştır. HL'de bazı karakterisitik klinik bulgular

kanser hücrelerinin salgıladıkları sitokinler ve hematopoetik büyüme faktörleri ile açıklanır. Bu faktörler sistemik B semptomları, eozinofili, immun yetmezlik, trombositoz ve fibrozisden sorumludur. Eozinofili IL-5 seviyesi ile, fibrozis TNF-alfa ile, sistemik semptomlar ise IL-6 seviyesi ile ilişkili bulunmuştur. Doğumsal ya da edinsel immünolojik bozuklukların HL riskini arttırmasının yanı sıra, önceden sağlıklı olan bireylerde gelişen HL da immün yetmezliğe yol açmaktadır. Mekanizmaları tam anlamı ile bilinmese de şu an ki veriler doğrultusunda fonksiyon gören B hücre proliferasyonunu inhibe eden TGF- β ve immünregulator olan IL-10 üzerinden yaptığı bilinmektedir.

Genetik Yatkınlık: HL'nin birden fazla aile bireylerinde görülmesi genetik bir yatkınlık olduğunu düşündürmüştür. Yakın geçmişteki çalışmalar epigenetik mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağlayarak patogeneizde genetik paterni bir kere daha önemli hale getirmiştir.

2.1.3. Hodgkin Lenfomanın Klinik Bulguları ve Laboratuvar

Özellikleri

Hodgkin Lenfoma'lı hastaların yaklaşık %90'ında görülen ilk bulgu lenf bezlerinin büyümesidir (30). Tutulan lenf nodu lastik kıvamında elastik ve ağrısızdır. Lenfadenopatilerin, en sık görüldüğü yer %80 oranında servikal bölgedir. İlk gelişte mediastinal bölgenin tutulması %60 oranında eşlik edebilir. Ayrıca aksiller bölge, inguinal bölge ve retroperitoneal bölge de tutulabilir (26). Bir lenf nodu veya nodal kitlenin ≥ 10 cm olmasına “bulky hastalık” denir (26). Bulky mediastinal hastalık: mediastinal kitlenin en geniş transvers çapının toraksın T5-T6 daki transvers çapına oranının

0.33 den büyük olmasıdır. Bu grup hastalarda nüks daha sık görülmektedir.

Dalağın büyük olması dalak tutulumunun göstergesi değildir. Dalak tutulumun sıklığı histolojik tip ile ilişkilidir. En fazla tutulum lenfositten fakir tipte görülür (26).

Hastalığın %30 'unda prognostik önemi olan B semptomları vardır. B semptomları son 6 ayda sebebi bilinmeyen ateş, %10'dan fazla kilo kaybı ve tekrarlayan gece terlemeleri olarak tanımlanır (31). Kaşıntı vakaların %15-25'ine eşlik eder.

Hastaların %17'sinde pulmoner hastalık vardır. Hastaların yaklaşık 2/3'ünde intratorasik tutulum olduğundan dolayı, hiler ya da mediastinal kitlesi olan hastalara mutlaka akciğer tomografisi çekilmelidir (26).

Nörolojik bulgular, genellikle geç dönemde ortaya çıkar. Metastatik olmayan nörolojik komplikasyonlar; metabolik bozukluklar, enfeksiyonlar (en sık HSV), kemoterapötiklere (en sık vinkristin) ve radyoterapiye bağlıdır.

Kemik tutulumu çok nadir olmak birlikte olması kötü prognoz göstergesidir (26). Kemik iliği tutulumu %5 vakada vardır. HL'nın kemik iliğini fokal tutması nedeniyle tanı için çoklu kemik iliği biyopsilerine ihtiyaç vardır (26).

Laboratuvar bulgularında normokrom normositer anemi, nötrofili (%50), eozinofili (%15) ve lenfositopeni görülebilir. Biyokimyasal olarak serum bakır, serum ferritin, eritrosit sedimentasyon hızı, fibrinojen, haptogloblin, serum alkalen fosfataz, serum soluble interleukin-2 reseptörü ve β 2-makroglobulin seviyeleri artmıştır.

İmmünolojik olarak da T hücre fonksiyonunda ve doğal öldürücü hücre aracılı sitotoksisiteye azalma görülebilir.

Tablo 2.7. HL'de klinik ve patolojik özelliklerin tümör hücrelerinden salınan sitokinlerle ilişkisi

HL' nin klinik ve patolojik özellikleri	Sitokinler
Konstitüsyonel B semptomları	TNF, LT- α , IL, IL-6
Polikaryon oluşumu	IFN- γ , IL-4
Skleroz	TGF- β , LIF, PDGF, IL-1, TNF
Akut faz yanıtı	IL-1, IL-6, IL-11, LIF
Eozinofili	IL-5, GM-CSF, IL-2, IL-3
Plazmasitoz	IL-6, IL-11
Hafif trombositoz	IL-6, IL-11, LIF
T/RS hücre ilişkisi	IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-9, TNF, LT- α , CD30L,
İmmün yetmezlik	TGF- β , IL-10
Otokrin büyüme faktörleri (?)	IL-6, IL-9, TNF, LT- α , CD30L, M-CSF
Artmış alkelen fosfataz	M-CSF
Nötrofil birikimi ve aktivasyonu	IL-8, TNF, TGF- β

(TNF, tümör nekrozis faktör; LT, lemfotoksin; IL, interleukin; IFN, interferon; PDGF, trombositlerden elde edilmiş büyüme faktörü; TGF, transforming growth factor; LIF, lösemi inhibitör faktörü; GM-CSF, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör; T, T hücreleri; H-RS, Hodgkin ve Reed–Sternberg hücreleri; M-CSF, makrofaj koloni uyarıcı faktör)

2.1.4. Hodgkin Lenfomanın Tanısı ve Evrelendirilmesi

Klinik değerlendirme, iyi bir anamnez ve lenf nodlarını içeren dikkatli bir fizik muayene ile başlar. Tanı için lenf nodundan yapılan eksizyonel biyopsinin histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi gerekir. Lenfoma hücrelerinin tam karakterinini belirlenmesi için genişletilmiş immünofenotipik incelemeye ihtiyaç vardır (Tablo 2.8).

Tablo 2.8. Klinik evrelerin belirlenebilmesi için yapılması gereken incelemeler

Anamnez ve fizik muayene *B semptomları sorgulanması
Hemogram, peiferik yayma
Sedimentasyon
Lenf nodu biyopsisi
Biyokimyasal incelemeler: Karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri, serum albumin, LDH, kalsiyum, ALP düzeyleri
Radyolojik incelemeler: P-A ve lateral akciğer grafisi, Toraks Tomagrafi, Abdomen ve pelvis tomografi, PET
Kemik iliği aspirasyonu
Gerekli olduğu zaman yapılacak incelemeler: karaciğer biyopsisi, manyetik rezonans görüntüleme (MRG), Teknesyum-99 kemik sintigrafisi, ultrasonografi, ekokardiyografi

Ann Arbor evreleme sistemi yaklaşık olarak üç dekadattır evrensel olarak kullanılmaktadır (32). HL aynı zamanda klinik bulgulara göre A, B ve E olarak alt evrelere ayrılır. Alt evre A, asemptomatik hastalığı, alt evre B, B semptomlarını, alt evre E ise minimal ekstralenfatik hastalığı belirtir. Çocukluk çağı HL tedavisinde kemoterapinin kullanımı, son yıllarda görüntüleme tekniklerinin gelişmesi ve operasyona bağlı komplikasyon riski nedeniyle cerrahi evreleme çok sınırlı vakada kullanılmaktadır (26).

Ann Arbor sınıflaması lenf nodlarının anatomik lokalizasyonlarını temel alarak düzenlenmiş, Costwold toplantısında alt gruplar eklenmiştir (32) (Tablo 2.9).

Tablo 2.9. HL'da Ann Arbor sınıflamasında Costwold Modifikasyonu

Evre	Açıklama
I	Bir tek lenf nodu bölgesi veya lenfoid yapı (örn: dalak, timus, Waldayer halkası) (I) veya tek bir ekstralenfatik organ veya bölge tutulumu (IE)
II	Diyaframın aynı tarafında iki ve daha fazla lenf nodu bölgesinin tutulması (II) veya sınırlı ekstralenfatik organ veya bölge tutulumu ve diyaframın aynı tarafında bir veya birden fazla lenf nodu bölgesi tutulumu (IIE)
III	Diyaframın her iki tarafında da lenf nodu bölgelerinin tutulumu (III) ve buna dalak tutulumunun eşlik etmesi (IIIS) veya sınırlı ekstralenfatik organ veya bölge tutulumu (IIIE) veya her ikisi de (IIISE) Splenik hiler, çölyak veya portal nodları içeren veya içermeyen tutulum (III1) Paraaortik, iliak veya mezenterik nodların tutulumu (III2)
IV	Ekstralenfatik organlardan veya dokulardan birinin lenf nodu tutulumlu ya da tutulumsuz yaygın veya ilerlemiş hastalık
A	Semptom yok
B	Altı ayda açıklanamayan %10'dan fazla kilo kaybı Açıklanamayan 38°C üzerinde ateş Gece terlemesi
X	Bulky hastalık: Nodal kitlenin ≥ 10 cm olması, Mediastinal kitlenin en geniş transvers çapının toraksın T5 –T6 daki transvers çapına oranının 0.33 den büyük olması
E	Sınırlı ekstralenfatik organ tutulumu

2.1.5. Hodgkin Lenfomanın Tedavisi

HL tedavisinde, kemoterapi ve düşük doz (20-25 Gy) tutulmuş olan radyoterapisinden (involved field radiotherapy-IFRT) oluşan kombine model benimsenmiştir. Bu tedavi biçimiyle yanıt oranları %90'lara kadar ulaşmaktadır. Standart kemoterapi, 6 döngü halinde MOPP (mekloreタミン, vinkristin, prokarbazin, prednizon) veya MOPP derivelerinden (örn. COPP) oluşabilir. ABVD (doksorubisin, bleomisin, vinkristin, dakarbazin) ve türevleri de kullanılabilir. Tek başına kemoterapi kullanılmasının radyasyona bağlı büyüme komplikasyonlarını, tiroid ve kardiyopulmoner fonksiyon bozukluklarını ve radyoterapiye bağlı ikincil kanser gelişim riskini azalttığı da öne sürülmektedir (26).

HL'nin tedavisinde evre ve yanıt-uyarlanmış tedavi ile risk-uyarlanmış tedavi seçenekleri de gündeme gelmiştir. Evre ve yanıt-uyarlanmış tedavi: erken evre hastalık evre I, IIA ve IIIA; ileri evre, evre IIB, IIIA2, IIIB, IV ve bulky hastalığı kapsar. Bu tedaviler kısa sürede az döngülü tedavilerdir. Risk-uyarlanmış tedavi: Tanı anında B semptomlarının varlığı, bulky hastalık varlığı, ektranodal yayılım, tutulan alan sayısı ve Ann Arbor evrelemesi göz önünde bulundurularak, hastalar düşük, orta ve yüksek risk olarak sınıflandırılırlar:

- Düşük risk: B semptomu ve bulky hastalık olmayan evre I ve II hastalar

- Orta risk: Evre IA ve IIA olup B semptomlarının eşlik etmesi, bulky hastalık, hiler lenfadenopati, üçten fazla alan tutulumu ya da ektranodal alan tutulumundan en az birinin eşlik etmesi ve evre IIIA hastalar
- Yüksek risk: evre IIIB ve IV hastalar

Prognostik faktörler:

1. Yaş: Çocuklarda erişkinlere göre prognoz daha iyidir.
2. Cinsiyet: Kızlarda erkeklere oranla prognoz daha iyidir.
3. Sistemik semptomlar: Ateş, kilo kaybı, gece terlemesi, kötü prognostik bulgulardır.
4. Evre: ileri evre, özellikle evre IV en kötü prognoza sahiptir.
5. Bulky hastalık: Hastalığın evresi, özellikle tutulan alanın hacmi ve tutulan alan sayısı ile ilişkilidir. Bulunması kötü prognostik faktördür.
6. Tam remisyon: Tam remisyondaki hastaların, remisyonu olmayan ve parsiyel remisyonu olan hastalara göre daha iyi prognozu vardır. Son yıllarda HL tedavisinde iki kür kemoterapi sonrası çekilen interim PET ile tam remisyon sağlanırsa prognozun iyi olduğu, hatta bu ek olarak mutlak monosit sayısı ile kombinasyonun bu özelliği daha da güçlendirdiği ifade edilmektedir (92).
7. Histopatoloji: Lenfosit baskın>nodüler sklerozan>karışık hücreli>lenfositten fakir. Lenfositten fakir tip nodüler sklerozan

tipe oranla daha düşük sağ kalım oranına sahiptir. Lenfositten fakir Hodgkin Lenfoma en agresif tipidir. İleri yaşlarda ve erkeklerde, kadınlara oranla daha sık görülür. Daha çok evre III ve evre IV olarak bulgu verir.

2.2. HODGKİN DIŞI LENFOMA

2.2.1. Hodgkin Dışı Lenfomanın Tarihçesi

Hodgkin dışı lenfomalar; B hücre öncülleri, T hücre öncülleri, matür B veya T hücrelerinden oluşan lenfoid dokuların maliyn tümörlerini içeren bir grup hastalıktır (9). Lenfoid maliyniteler hematopoetik öncü hücrelerin farklı gelişim basamaklarında kalması sonucu oluşan neoplaziler olması nedeniyle çocukluk çağı HDL'leri farklı morfolojik, immünolojik ve klinik tablolar göstermektedir (33). Erişkin dönemde gelişen HDL'lerin %90'ı B hücre kaynaklı iken çocukluk çağı HDL'lerinde B ve T hücre kökenli olanlar eşit oranda görülmektedir. Çocukluk çağı HDL'lerin büyük çoğunluğu yüksek dereceli olup; hızlı büyüme, kemik iliği (Kİ) ve santral sinir sistemi (SSS) tutulumu ile ortaya çıkmaktadır (34).

Günümüzde hastaların %75'i modern tedavilerle iyileştirilmekte, çoğu çalışma da tedavinin akut ve uzun dönem yan etkileri azaltmayı hedeflemektedir. HDL'nin moleküler biyoloji ve immünolojisinin daha iyi anlaşılmasıyla, daha doğru sınıflama sistemlerinin oluşturulması, görüntüleme ve evreleme sistemlerindeki ilerlemeler, HDL'nin ve tedavisinin hayatı tehdit edici komplikasyonlarına karşı daha iyi destek

tedavilerinin geliştirilmesi ve ileri evre hastalarda daha yoğun kemoterapotik ajanların kullanılmasına dayalı tedavilerde HDL'li çocuklarda daha iyi tedavi sonuçlarına ulaşmaya önemli katkıda bulunmuştur.

2.2.2.Hodgkin Dışı Lenfomada Histopatoloji ve Sınıflama

Pediyatrik HDL'leri hem klinik prezantasyon ve tedaviye yanıt, hem de lenfomanın alt türlerinin dağılımında yetişkin lenfomalardan farklılık göstermektedir (Tablo 2.5). Prekürsör (lenfoblastik) lenfomalar çocuklarda sıktır; pediyatrik HDL'lerin %30'unu oluştururlar. Çocuklarda erişkinlere oranla ektranodal hastalık ve ileri evre hastalık (evre III veya IV) genelde daha sık görülür. Çocuk ve ergenlerde görülen HDL'lerin 4 büyük histolojik alt grubu ve görülme sıklıkları Tablo 2.10'da verilmiştir. 20 yaşın altındaki HDL hastalarının %95'inden fazlasında bu alt tipler görülmektedir.

Tablo 2.10. Çocukluk Çağı HDL'lerin Histolojik Alt Grupları (8)

HDL Histolojik Alt Grupları	Sıklık (%)
▪ Burkitt Lenfoma (Klasik ve Burkitt Benzeri Lenfoma)	40
▪ Lenfoblastik Lenfoma (LBL)	30
▪ Yaygın Büyük B Hücreli Lenfoma (YBBHL)	20
▪ Anaplastik Büyük Hücreli Lenfoma (ABHL)	10

Çocukluk çağında görülen matür B hücreli HDL'lerin çoğu Burkitt lenfoma (BL) (klasik ve Burkitt benzeri lenfoma) ve diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL) alt gruplarına aittir. Çocukluk çağında nadir olarak görülen düşük dereceli matür B hücreli HDL alt gruplarında Foliküler Lenfoma (FL) ve Marjinal Zon Lenfoma (MZL) bulunur. Pediyatrik matür B hücreli HDL'ler, pro-proliferatif proteinlerin aşırı ekspresyonuna bağlı olarak, yüksek proliferasyon indeksine sahip neoplazilerdir. Bu özelliklerinden dolayı patogeneizde erişkinlerde daha sık görülen apoptozis defektlerine göre daha fazla oranda görülen anormal proliferasyon sorumlu tutulmaktadır (35).

Burkitt Lenfoma (BL): Viral bir patojenle ilişkilendirilen ilk maliynite, onkojen aktivasyonu ile ilişkili translokasyonların tanımlandığı ilk kanserlerden ve HIV ile ilişkili olduğu bildirilen ilk tümör olan BL, pediyatrik HDL'nin yaklaşık %30-50'sini oluşturmaktadır. İrlandalı bir cerrah olan Denis Burkitt, lokalizasyonu, histopatolojisi ve coğrafi dağılımı açısından bazı farklılıkları olan bu lenfoma türünü Afrikalı çocuklarda 1958 yılında tariflemiştir. EBV varlığı ilk kez 1964 yılında BL'nin etyolojisine yönelik araştırmalar esnasında ortaya konulmuştur (36). Bilinen en hızlı büyüyen (iki katına çıkma süresi 12-24 saat) tümör olan BL, sadece kemoterapi ile iyileşme bildirilen ilk çocukluk çağı kanseridir. WHO sınıflamasına göre klinik prezantasyonu ve biyolojisi farklı ancak morfolojik olarak aynı olan 3 alt tipi belirlenmiştir; endemik BL, sporadik BL ve immun yetmezlik ilişkili BL (11,43).

- ❖ Endemik BL, ekvatoryal Afrika, Papua Yeni Gine ve Güney Afrikanın ekvatoryal bölgeleinde görülür. Vakaların %95'i EBV ilişkilidir
- ❖ Sporadik BL, dünyanın herhangi bir bölgesinde görülür. Gelişmiş ülkelerde HDL'nin ve matür B hücre neoplazilerinin en sık görülen formudur. EBV ile ilişkisi %10-15'tir.
- ❖ İmmün yetmezlik ilişkili BL, özellikle HIV ile enfekte hastalarda görülür. %70 hastada EBV ile ilişkilidir.

BL hücreleri hemen her zaman B hücre antijenlerinden CD19, CD20, CD22, CD79a ve yüzey immunglobulin eksprese ederler. CD5, CD23, TdT tipik olarak negatiftir (11). BL hücreleri BL-spesifik kromozomal translokasyonları taşır. Çoğunlukla t (8;14), daha az sıklıkta t (2;8) ve t (8;22) bulunur. Diğer epigenetik modifikasyonlara bağlı olarak oluşan bütün translokasyonlar c-myc proto-onkogenin aktivasyonu ile sonuçlanır.

Tümör son derece yüksek bir proliferasyon indeksine sahip olduğundan mitotik figürlere çok sık rastlanır. Apoptozisin çokluğu dikkat çeker. Apoptotik hücreleri fagosit eden normal makrofajların tümör hücreleri içinde dağılması ile ortaya çıkan görüntüye “yıldızlı gökyüzü manzarası” adı verilir. Bu görüntünün BL'ye özgü olmadığı, apoptotik indeksi yüksek diğer tümörlerde de görülebileceği unutulmamalıdır (11).

Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DBBHL): WHO sınıflamasına göre normal lenfositlerin iki katından daha büyük ve doku makrofajları ile aynı boyutta ya da daha büyük neoplastik lenfoid hücreler içeren B lenfoid

hücrelerin diffüz proliferasyonu olarak tanımlanır. Pediyatrik HDL'lerin ortalama %20'sini oluşturmaktadır ve ergenlik çağındaki çocuklarda ve büyük çocuklarda daha siktir. DBBHL hücreleri *Pax5*, *CD79a*, *CD19* ve *CD20* ekprese ederken diğer B hücre belirteçlerini değişen oranlarda taşırlar. DBBHL herhangi bir özgül sitogenetik bozukluk ile ilişkili değildir. DBBHL, immünfenotipik olarak germinal merkez B hücre benzeri grup (GMB) ve germinal merkez B hücre benzeri olmayan grup (non-GMB) olarak ikiye ayrılır. Bu ayırım özellikle prognostik önem taşımaktadır: GMB grubun prognozunun daha iyi olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Pediyatrik olgular daha çok bu gruptan olup prognozları daha iyidir. (37-40).

2.2.3. Hodgkin Dışı Lenfomada Epidemiyoloji ve Etiyolojik Faktörler

HDL, Avrupa ve Amerika Birleşik Devleti'nde tüm çocukluk çağı malignitelerinin %6–7'sini oluşturur. Çocukluk çağı maligniteleri içerisinde 3. sırayı alır. İnsidansı 10.5/1.000.000'dur. Ancak BL endemik formunun sıtmanın holoendemik olduğu ve EBV enfeksiyonu ile erken yaşlarda karşılaşılan Orta Doğu, Nijerya, Uganda gibi ülkelerde insidans 150/1.000.000'dur. Çocukluk çağı ve 20 yaş altı adolesan dönemde tüm lenfomaların %45'ini oluşturur. Erkek/kız oranı 2,5:1' dir, 5-14 yaş arasında 3:1 görülür. Tüm yaşlarda görülebilir ancak DBBHL insidansının daha çok arttığı 15-19 yaşlar arası pik yapar (26).

HDL'nin etyolojisi bilinmemektedir. İlaçlara (immünsupresif ilaçlar hariç) ve radyasyona maruz kalma HDL için major risk faktörü değildir (33). HDL, HL tedavisinin bir komplikasyonu olarak görülebilir. Erişkin dönemdeki tedavisi biten HL'li vakaların %5'inde HDL ikincil kanser olarak görülmektedir ancak bu risk çocukluk çağında oldukça düşüktür. Kalıtsal ya da kazanılmış immün yetmezlik sonrası ortaya çıkan immün supresyon, HDL gelişimi ile açıkça ilişkilidir. Wiskott-Aldrich sendromu, X'e bağlı agammaglobulinemi, ataksi-telenjiyektazi, sık değişken immün yetmezlik, ağır kombine immün yetmezlik, Chediak-Higashi sendrom'lu çocuklar, kendi sağlıklı yaş grubu çocuklara göre 100 ile 10.000 kat daha fazla HDL geliştirme riskine sahiptir. X' e bağlı lenfoproliferatif sendromda da risk artmıştır. HIV ile enfekte çocuklarda da lenfoproliferatif hastalık geliştirme riski (özellikle BL ve DBBHL) yüksektir.

Sağlıklı kişilerde EBV, B hücrelerini poliklonal proliferasyonla ölümsüz hale getirir ancak bu olay EBV'ye spesifik sitotoksik T hücreleri ile kontrol edilir (42). İmmün yetmezlikli hastalarda ise kontrol altına alınamaz.

HDL, tek öncül hücrenin klonal proliferasyonu sonucu oluşur; maliyn dönüşüm tek lenfoid progenitor hücreden başlar ve farklılaşma kapasitesini kaybetmiş immatür hücreler hastalığı oluşturur. Mevcut deliller, lenfomaların proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptozisi etkileyen genetik değişimler sonucu olduğunu ileri sürmektedir. Proliferasyon ve apoptozis, normal immün sistem gelişim ve immün yanıt için gereklidir.

Sitogenetik alışmalar, HDL'nin tekrarlayan non-random kromozom translokasyonları ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Translokasyonda rol alan genlerin hücre döngüsü veya apopitoziste görevli olduğu bilinmektedir. Güncel çalışmalarda bu değişime katkı sağlayan nedenler arasında epigenetik mekanizmalar üzerinde durulmaktadır.

2.2.4.Hodgkin Dışı Lenfomanın Kliniği ve Labaratuvar zellikleri

HDL'nin farklı histolojik alt gruplarında, farklı klinik özellikler görülmektedir.

Burkitt Lenfoma (BL): Sporadik ve endemik BL'de tutulum bölgeleri ve yayılımları farklıdır. Endemik BL'de çene en sık tutulan bölge iken, sporadik BL'de karın ve kemik iliği en sık tutulan bölgelerdir. Endemik BL'de maksiller hastalık olsun ya da olmasın, orbital tümör eşlik edebilir. Yine endemik BL'de abdominal hastalık ta görülür ancak tutulum yeri ileum ve ekumun aksine mezenter ve omentumdur. Kemik iliği tutulumu nadirdir ancak vakaların 1/3'nde merkezi sinir sistemi tutulumu vardır. Sporadik BL'de en sık tutulum yeri karındır. 5-10 yaş arası erkeklerde sık görülür. Karın ağrısı veya karında şişlik, bulantı, kusma, gastrointestinal kanama, nadiren perforasyon başvuru bulgularıdır. İlioekal intususepsiyona bağlı olarak sağ alt kadranda kitle ya da akut karın ağrısı %25-30 hastada görülebilir ve akut apandisit ile karışır. Baş-boyun bölgesi, ikinci en sık tutulan bölgedir. Özellikle paranasal sinüs ve tonsilleri tutar. Endemik BL'nin aksine, çene tutulumu %10'dan az

hastada görülür. Kemik iliği tutulumu sporadik BL'li hastaların %20'sinde görülür. Bu hastalar tümör lizis sendromu açısından yüksek riskli hastalardır. Ülkemizde görülen BL olguları, endemik ve sporadik BL arasında klinik bulgular oluşturmaktadır ve Orta Doğu tipi BL olarak da adlandırılır (44). Endemik ve sporadik BL arasında farklar Tablo 2.11'de belirtilmiştir (33).

Tablo 2.11. Endemik ve Sporadik BL arasındaki farklar (33)

Özellik	Endemik	Sporadik
Klinik özellikler	5-10 yaş; Erkek > Kız	6-12 yaş; Erkek > Kız
Coğrafik dağılım	Ekvatoryal Afrika, Yeni Gine, Amazonlar, Brezilya, Türkiye	Kuzey Amerika, Batı Avrupa
Yıllık İnsidans	10/ 100.000	0,2 /100.000
Tümör yerleşimi	Çene, BOS abdomen, MSS,	Abdomen, kemik iliği, lenf nodları, overler
Histopatolojik Özellikler	Diffüz, monomorfik orta boy hücreler, yıldızlı gökyüzü manzarası	Aynı
İmmunolojik Özellikler	CD20 (+), IgM, β ya da λ CD10 (+), <i>BCL2</i> (-)	CD10 (+), IgM, β ya da λ CD10 (+), <i>BCL2</i> (-)
EBV DNA varlığı	%95	%15
t (8;14), t (2;8), t (8;22) varlığı	Evet	Evet
Kromozom 8 kırılma noktası	<i>cMYC</i> geni distalinde	<i>cMYC</i> geni içinde

Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DBBHL): Oldukça heterojen klinik bulgular gösterir. Mediasten tutulumu BL'ye göre sıktır, kemik iliği ve merkezi sinir sistemi tutulumu nadir görülür. Tümör; perikard, plevra gibi organlara lokal invazyon gösterir, genellikle süperior vena kava sendromuna neden olur (33). Hastalığın özgün bir laboratuvar bulgusu yoktur. İleri evre hastalıkta LDH yüksekliği tipiktir. Kemik iliği tutulumu olan hastalarda beyaz küre yüksekliği, anemi ve trombositopeni görülür. DBBHL'nin sık görülen abdominal tipi ile DBBHL alt gruplarından, özel bir antite olan mediastinal (timik) tipi vardır.

DBBHL'nin sık görülen abdominal tipinde, tümör hücreleri CD19, CD20, CD22 ve CD79a gibi B hücre belirteçlerini bulundurlar, ancak bunlardan biri veya daha fazlası eksik olabilir. Yüzey ve/veya sitoplazmik immünoglobulin (IgM > IgG > IgA) % 50-75 vakada gösterilebilir. İmmünofenotipik olarak germinal merkez B hücre benzeri grup (GMB) ve germinal merkez B hücre benzeri olmayan grup (non-GMB) olarak ikiye ayrılmaktadır. Çocuk ve ergenlerde görülen DBBHL'larda sitogenetik anormallikler özgün olmamasına karşın oldukça tekrarlayıcı özelliktedir. *BCL-2* translokasyonları t (14;18) (q32;q21) nadiren görülmekte iken *C-MYC* onkogeni ile olan translokasyonlar t (8;14) daha sık (pediatrik DBBHL olgularının % 30-40'ında) görülmektedir (36-37).

DBBHL alt gruplarından olan Primer mediastinal (timik) büyük hücreli lenfoma ise, mediastende timik B hücrelerinden gelişir ve çoğunlukla ergenlerde ve genç erişkin kadınlarda görülür. İmmünofenotipik

ve genotipik olarak farklılıklar içermektedir. Morfolojisinde yaygın büyük hücre proliferasyonu, Reed-Stenberg benzeri hücreler ve çeşitli derecede kompartmanlara ayrılmış sklerozis görülür. Bu tipin HL'dan ayırt edilmesi immünojenotipik inceleme ile mümkün olacaktır (35).

Mediastinal büyük B hücreli lenfoma da matür B hücre fenotipine uyacak şekilde CD19, CD20, CD22, CD79a pozitifliği gösterir. Yüzey immünooglobulini bulunmazken sitoplazmik Ig mevcuttur (35). Mediastinal büyük B hücreli lenfomada; *MYC*, *BCL-2* ve *BCL-6* genlerinde yeniden yapılanma yoktur (45).

2.2.5. Hodgkin Dışı Lenfomanın Tanısı ve Evrelendirilmesi

İyi bir sitolojik ve histolojik örnek, kesin tanı ve doğru sınıflama için gereklidir. Tanıdaki problemlerin çoğu, uygunsuz ve yetersiz materyalden kaynaklanır. Uygun lenf bezinin seçimi ve histolojik örnek çok önemlidir (33). Seçilmiş vakalarda sitogenetik, FISH, gen analizi yapılabilir (Tablo 2.12).

Evrelendirmede amaç, hastaları farklı prognostik risk gruplarına ayırmak ve tedavilerini buna göre düzenlemektir. Çocukluk çağı HDL için çeşitli evrelendirme sistemleri kullanılmıştır. Murphy tarafından 1978'de önerilen, Hodgkin hastalığı için kullanılan Ann Arbor evreleme sisteminin bir modifikasyonu olan, St.Jude Research Hospital evreleme sistemi pediatrik olgularda tüm histopatolojik alt gruplar için büyük kabul görmüştür (Tablo 2.13).

Tablo 2.12. HDL'li hastanın değerlendirilmesi

- Anamnez ve fizik muayene
- Kan sayımı, serum elektrolitleri: kalsiyum, fosfor, magnezyum
- Böbrek fonksiyon testleri, karaciğer fonksiyon testleri
- LDH seviyesi
- Çözünmüş interlökin-2 reseptör (IL-2R) seviyesi (mümkünse)
- Yeterli biyopsi materyali
- Viral çalışmaları: HIV, hepatit A, B, C, CMV-HSV-varisella antikorları
- Kemik iliği aspirasyon ve biyopsisi (bilateral)
- Beyin omurilik sıvısı, peritoneal, perikardiyal yada plevral sıvı örnekleme: sitoloji, sitogenetik, immünolojik ve moleküler inceleme
- PA-akciğer grafisi, göğüs tomografisi, karın ultrasonografisi ve tomografisi
- Etkilenen bölgenin düz grafisi ve tomografisi
- Galyum sintigrafi
- Magnetik rezonans görüntüleme (gereğinde)
- BL'li olgularda diş muayenesi

Tablo 2.13. St. Jude evreleme sistemi

EVRE I	Tek lenf nodu tutulumu ya da tek ektranodal organ tutulumu (mediasten ve abdomen hariç)
EVRE II	• Tek ektranodal organ ve birlikte bölgesel lenf nodu tutulumu • Diyaframın aynı tarafında 2 ya da daha fazla lenf nodu tutulumu • Diyaframın aynı tarafında lenf nodu tutulumu eşlik eden veya etmeyen 2 ektranodal tutulum • Mezenterik lenf nodunun eşlik ettiği veya etmediği tamamı çıkarılmış primer karın içi kitlesi
EVRE III	• Diyaframın iki tarafında iki ektranodal tutulumu • Diyaframın iki tarafında 2 veya daha fazla lenf nodu tutulumu • Herhangi bir intratorasik tümör (mediastinal, timik, plevral) • Yaygın primer karın içi kitle • Başka taraf tutulumu olsun olmasın parasipinal ya da epidural tümör
EVRE IV	Yukardakilerden herhangi birine eşlik eden SSS* veya kemik iliği** tutulumu (kemik iliğinde blast oranı %25'in altında ise tutulum olarak değerlendirilir.)

* Santral sinir sistemi tutulumu kriterleri: 1) Kraniyal BT ya da MRG'de intraserebral kitle 2) Kraniyal sinir felci (Ekstradural

kitlenin neden olmadığı) 3)Beyin omurilik sıvısında blast görülmesi; En az bir kriter yeterli (80)

** Kemik iliği tutulumu: Kemik iliğinde %5-25 oranında blastik hücre olması; >%25 blast lösemi kabul edilir

2.2.6.Hodgkin Dışı Lenfomanın Tedavisi

HDL'de hayatı tehdit edici 2 komplikasyon vardır: Sıklıkla LL'de görülen mediastinal tümöre bağlı süperior vena kava sendromu ve kritik hava yolu tıkanıklığı ile BL'de kemoterapiye bağlı metabolik komplikasyonların neden olduğu tümör lizis sendromu.

Intratorasik lezyonlara yaklaşım: Hastalar mutlaka oturur pozisyonda olmalıdır ve genel anesteziden kaçınılmalıdır. Lokal anestezi altında periferik lenf nodundan biyopsi, plevral efüzyon varlığında da sıvıdan sitolojik örnekleme yapılmalıdır. Bütün bu yaklaşımlar, hastanın genel durum bozukluğunda ertelenebilir. Bu durumda kortikosteroidler (radyasyon ile birlikte ya da değil) kitle küçülene kadar kullanılabilir. Ardından genel anestezi altında biyopsi yapılabilir.

Tümör lizis sendromuna yaklaşım: Özellikle BL ve T hücreli lösemi/lenfomada görülür. Hızlı hücre çoğalımı, hızlı hücre ölümünü de beraberinde getirir. Hücrelerden açığa çıkan iyonlar, metabolik komplikasyonlara neden olur: hiperürisemi, hiperkalemi, hiperfosfatemi, hipokalsemi, böbrek yetmezliği. Tümör lizis sendromu eğer iyi tedavi

edilmezse kalp aritmileri, böbrek yetmezliği, nöbet, koma, yaygın damar içi pıhtılaşma ve ölüm ile sonuçlanabilir (Tablo 2.14).

Tablo 2.14. Tümör lizis sendromuna yaklaşım

- Hidrasyon ve alkalinizasyon: idrar dansitesi <1010 , idrar pH 6.5-7.5 ve saatlik idrar çıkışı $100 \text{ ml/m}^2/\text{saat}$ olmalı
- Diürez: furosemid, furosemid ve hidrasyona rağmen oligürik hastalarda mannitol
- Ürik asit azaltılması: allopürinol ya da Rasburikaz
- Lökosit azaltılması: lökoferez ve kan değişimi; beyaz küre sayısı $>100.000/\text{mm}^3$
- Trombosit desteği: kafa içi kanama riskini azaltmak için trombosit değeri $> 20,000/\text{mm}^3$ olacak şekilde destek verilmesi
- Kan transfüzyonu: Hemoglobin değerinin 10 g/dl düzeyinde tutulması
- Hasta stabilize olduğunda ve yeterli idrar çıkışı sağlandığında kemoterapiye başlanması
- Diyaliz: ilerleyici böbrek yetmezliğinde (potasyum $>6 \text{ mEq/L}$, fosfor $>10 \text{ mg/dL}$, oligüri, anüri ve volüm yüklenmesi durumunda)
- Monitörizasyon: 6 saatte bir elektrolit (kalsiyum, fosfor), ürik asit, BUN, kreatinin, tam kan sayımı, idrar çıkışı, idrar dansitesi ve pH
- Hiperkalemi ve hipokalsemi durumunda solunum, kardiyak ve MSS monitorizasyon

Lenfoblastların çoğalması oldukça hızlı olduğundan (ikiye katlanma zamanı <24 saat), HDL’de başarılı bir tedavi, hücrelerin yeniden çoğalmasına fırsat vermeyecek kısa sürede ve yoğun olmalıdır. Bölünmüş dozlarda siklofosfamid ve sürekli infüzyon şeklinde doksorubisin veya sitozin arabinozidin kortikosteroidlerle birlikte kullanılması, başarılı bir HDL tedavisinin unsurlarını oluşturur (26).

Tedavi grupları aşağıdakiler gibi sınıflandırılabilir:

- Lokalize (evre I ve II) lenfoblastik lenfoma
- İleri evre (evre III ve IV) lenfoblastik lenfoma
- Lokalize (tamamen çıkarılmış evre I ve abdominal evre II) B hücre NHL, BL, B lenfoblastik lenfoma, diffüz B hücreli lenfoma ve diffüz büyük hücreli lenfoma
- Orta risk: tamamen çıkarılmamış evre I hastalar, diğer tüm evre II hastalar (tamamen çıkarılmış abdominal evre II hastalar hariç), evre III hastalar, merkezi sinir sistemi tutulumu olmayan veya kemik iliğinde %25’ten az blast olan evre IV hastalar
- Merkezi sinir sistemi tutulumu veya kemik iliğinde %25’ten fazla lenfoblast saptanan BL, B hücreli lenfoblastik lenfoma ve diffüz büyük hücreli lenfoma
- Büyük hücreli anaplastik HDL

Bu hasta grupları değişik kemoterapi ajanlarının kullanıldığı farklı tedavi modelleri ile tedavi alırlar. Son yıllarda en çok kullanılan

kemoterapi rejimleri şunlardır:

- St.Jude Total B
- LMB
- BFM-NHL (34).

Bu tedavi protokollerinden B hücreli NHL-BFM 95 tedavi protokolü

Tablo 2.15 'de verilmektedir.

Tablo 2.15. B Hücreli NHL-BFM 95 Tedavi Protokolü (47)

Burkitt ve Büyük B Hücreli Lenfomalar		EFS (3 yıl)
R1	➤ İki kür: A-B	% 94
R2	➤ Prefaz ardından 4 kür: A-B-A-B	% 94
R3	➤ Prefaz ardından 5 kür: AA-BB- CC-AA-BB	% 85
R4	➤ Prefaz ardından 6 kür: AA-BB- CC-AA-BB-CC	% 81

A: Dexamethasone, VCR, IFOS, Ara-C, VP-16, MTX (1gr/m2) ve üçlü intratekal tedavi

B: Dexamethasone, VCR, CPM, Doksorubisin, MTX (1gr/m2) ve üçlü intratekal tedavi

- AA ve BB kürlerinde MTX dozu 5gr/m2'ye yükseltilir
- CC: Dexamethasone, Vindesine, yüksek doz Ara-C, VP-16 ve üçlü intratekal tedavi
- R3 ve R4'te 5 kür sonunda canlı tümör varsa otolog yüksek doz kemoterapi ve kök hücre nakli planlanmıştır

Fransız Pediatrik Onkoloji Grubu (SFOP) B hücreli HDL'leri risk gruplarına göre tedavi edebilmek için bir risk sınıflaması oluşturmuş ve

St.Jude evrelemesinin uyarlanması ile oluşturulan bu sınıflama uluslararası olarak kabul edilmiştir. Bu sınıflamaya benzer olarak NHL-BFM 95 protokolünde de hastalar risk gruplarına ayrılmakta ve bu risk gruplarına göre tedavi edilmektedir. Risk sınıflamaları Tablo 2.16 ve 2.17’de verilmektedir.

Tablo 2.16. B Hücreli HDL İçin Risk Sınıflaması (SFOP) (48)

Grup	Tümör Yaygınlığı
A	▪ Cerrahi olarak tam çıkarılan Evre I ▪ Abdominal Evre II tümörler
B	▪ Çok sayıda abdomen dışı tümör ▪ Cerrahi olarak çıkarılamayan Evre I, II, III, SSS (-), Kİ <% 25 blast
C	▪ SSS (+), Kİ ≥ % 25 blast (olgun B ALL)

Tablo 2.17. B-Hücreli NHL-BFM 95 Protokolü Risk Grupları (47)

R1	▪ Evre I ve II, cerrahi olarak tam çıkarılan
R2	▪ Evre I ve II, cerrahi olarak tam çıkarılamayan ▪ Evre III ve LDH < 500 U/L
R3	▪ Evre III ve LDH 500-999 U/L ▪ Evre IV Kİ (+) veya B hücreli lösemi ve LDH < 1000 ve SSS (-)
R4	▪ LDH ≥ 1000 U/L ve/veya SSS (+)

HDL' de prognostik faktörler;

Olumlu prognostik faktörler

- Primer tutulum yeri
- Evre I ve II baş ve boyun (parameningeal olmayan)
- Periferik lenf nodu tutulumu
- Abdominal tutulum: %80 veya daha fazla 2 yıllık yaşam

Olumsuz prognostik faktörler

- Evre III ve IV (MSS tutulumlu evre IV hastalar en kötü prognoz)
- Tutulum yeri: parameningeal evre II, ektranodal her evre, baş ve boyunda lenfatik dışı tutulum (sinüs, çene, orbita), evre III küçük çentiksiz hücreli lenfomada plevral efüzyon
- İlk 2 ayda remisyon sağlanmaması
- Çözünmüş IL-2R seviyesi >1000 U/mL

- LDH seviyesi >1000 U/L
- Ürik asit seviyesi >7.1 mg/dL

Tedavide genellikle radyoterapinin yeri yoktur. Akut hayatı tehdit edici komplikasyonlarda (örn; süperior vena kava sendromu), lokal nükslerde seçilmiş olgularda, mediastinal lokalize rezidüel tümörlerde, başlangıç kemoterapiye dirençli durumda endikedir. Doz ve alan kısıtlıdır. Merkezi sinir sistemi tutulumu olan B hücreli HDL'de kraniyal ışınlama kullanılmamalıdır. Merkezi sinir sistemi profilaksisi için kraniyal ışınlamanın kullanımı tartışmalıdır. Fakat ileri evre lenfoblastik lenfomada birçok protokol tarafından kullanılmaktadır (26).

HDL tedavisinde cerrahinin rolü sınırlıdır. Tam rezeksiyonun yapılabileceği hastalarda uygulanmalıdır (örneğin; lokalize barsak hastalığı). Yaygın hastalığı olanlar, cerrahi rezeksiyon için uygun değildir (26).

2.2.7. Hodgkin Dışı Lenfomada Prognoz

Sınırlı hastalığı olan HDL olgularında 5 yıllık EFS % 90-95 olup prognoz çok iyidir. İleri evre hastalıkta ise prognoz histolojik alt gruplara göre değişim göstermekle birlikte önceki yıllara göre iyileşme göstermiştir (5 yıllık EFS % 60- 90) (48).

BL'da LDH $\geq$ 1000 U/L olması, SSS hastalığı, indüksiyon tedavisine yanıtızsızlık, yaş > 15 olması ve YBBHL'da ise kızlarda yaş > 14

olması, primer mediastinal tutulum, LDH $\geq$ 500 U/L olması kötü prognostik risk faktörleri olarak kabul edilmektedir (49).

2.3. KANSER

Kanser, gelişmekte olan dünyamızda giderek artan ve toplum sağlığını önemli ölçüde etkileyen sağlık problemlerinin başında yer almaktadır. Türkiye’de her iki cinsiyette seneler içinde artış gösteren kanserler bağırsak, rektum, lenfatik ve hematopoietik doku kanserleridir.

Yaşam kalitesinin artmasına bağlı olarak kanser gelişme riski de artış göstermektedir. Bununla birlikte kanser tanısında kullanılan yöntemlerin hızla ilerlemesi ve maliyetlerinin düşmesi sebebi ile daha çok hastanın hekime başvurması ve gelişen teknoloji ile çevresel karsinojenlere maruziyetin artışı kanser sıklığını arttıran diğer etkenlerdendir.

Kanser tek bir hastalık adı olmayıp organizmada meydana gelen ve hücreleri kontrolsüz büyüyen maliyn tümörler için kullanılan genel terimdir. Bu tip hücreler beniyin tümörlerin aksine başka dokulara invazyon ve metastaz özelliği gösterir. Ülkemizde 2012 yılında kanserler ölüme sebep olan hastalıklar içerisinde %21,1 ile ikinci sırada yer almaktadır. Karsinogenez çok faktörlü ve çok basamaklı bir olaydır. Normal bir hücrenin kanser hücreğine dönüşmesi için çok sayıda genetik değişikliklerin olması gereklidir. Bunlar arasında nokta mutasyonları, translokasyonlar, gen amplifikasyonları, hücresel onkogen aktivasyonu ve

tümör süpresör genlerin (anti-onkogen) inaktivasyonu gibi mekanizmalar yer alır (50). Kanserin genetik yapısı Tablo 2.18’de sadeleştirilerek özetlenmiştir.

Bazı kanser türlerinde primer ve sekonder faktörler olarak adlandırılan iki etken vardır. Primer faktör olarak anormal gen sorumlu tutulurken, sekonder faktörde çevresel faktörler sorumlu olup hücre çoğalması gerçekleşmektedir. Mutasyonlar hücre bölünmesi sırasında sürekli bir şekilde gerçekleşmektedirler ve onkogenler ile tümör süpresör genler diğer genlere kıyasla daha az mutasyona uğramaya meyillidirler. Kanserlerdeki mutasyonları diğer mutasyonlardan farklı yapan, mutasyonların güçlü bir şekilde hücresel artış ve uzun hücresel yaşam için pozitif seleksiyona yol açmalarıdır.

Kanserlerin oluşum sıklığı, türüne, coğrafi bölgelere, sosyo-ekonomik yaşam kalitelerine, hasta yaş ve cinsiyetine göre farklılık göstermektedir (38). Kanserin hücre içindeki gelişimi hemen tamamlanıp sona ermez; normal bir hücre kanserli hücreye dönüşmeden önce o hücrenin genetik bilgisinde pek çok değişiklik olması gerekmektedir. Yapılan araştırmalar onkogeneze için tek bir genetik değişimin yeterli olmadığını, tümör süpresör genler, proto-onkogenler ve yapısal genlerde bir dizi mutasyonun oluşması gerektiğini göstermiştir. Kanser gelişimi, genetik açıdan çok aşamalı bir süreçtir; bu sırada oluşan mutasyonlar kendiliğinden ya da mutajenik etkilere bağlı olarak gelişebilir.

Hücrelerin anormal büyüme süreci aşama aşama gerçekleşmektedir. Her bir genetik değişiklik, hücreyi anormal büyüme sürecinde biraz daha ileriye taşır. Tüm hücrelerin genetik özellikleri birebir aynı olmadığı için, genetik değişikliklerin ne zaman gerçekleşeceğini tahmin etmek neredeyse imkânsızdır. Bu nedenle bazı kanser tipleri oldukça yavaş bir seyir gösterirken, bazıları ise hızla ilerleyip bir kaç ayda bireyin sağlığını bozmaktadır. Birçok kanser türünde, tümör dokusunda belirlenen özgün onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde hipermetilasyon, mikrosatellit instabilitesi, kromozomal translokasyonlar, nokta mutasyonları ve heterozigotluk kaybı (LOH) gibi moleküler düzeydeki değişikliklerin, hastaların önemli bir bölümünün periferik kan hücrelerinde de olduğu bildirilmiştir (52).

Tablo 2.18. Kanserin Genetik Yapısı (51)

I.	Bir kanserin sporadik olarak bireylerde izlenmesine ya da herediter bir özellik göstererek bir ailenin bazı bireylerinde tekrar etmesine bakılmaksızın, kanser genetik bir hastalıktır.
II.	Kanser başlangıcında etkisi olan genler: - Hücre proliferasyonunda sinyal iletiminde yer alan proteinleri - Kontakt inhibisyonun oluşumunda yer alan hücre bileşenlerini - Mitotik siklus düzenleyicilerini - Programlanmış hücre ölümü bileşenlerini - Mutasyonların tanımlanması ve tamirinden sorumlu olan proteinleri kodlayan genlerdir.
III.	Kanser oluşumundan sorumlu mutasyonlar: - Bir proto-onkogenin bir allelinin işlev kazandıran mutasyonla etkinleşmesi - Bir tümör baskılayıcı genin bir allelinin başat olumsuz (dominant negatif) mutasyonu ya da her iki allelin işlev kaybı - Genlerin yanlış ifadenmesine ya da yeni bir işlevsel özellik kazanmasına yol açan kimerik genlerin oluşumuna neden olan kromozomal translokasyonlardır.
IV.	Dönüşüm bir kez başladığında; sitogenetik yapının korunmasından ve DNA'da oluşabilecek hasarı tamirden sorumlu hücresel mekanizmaları kodlayan genlerin mutasyonu ya da epigenetik sessizliği şeklinde ek genetik hasarların biriken etkisiyle kanser yaygınlaşır.

2.3.1.Tümör Gelişimi

Tümör, bir diğer adıyla neoplazi, yeni büyüyen ve yeni oluşan anormal doku kitlesidir. Büyümesi normal doku büyümesine kıyasla fazladır ve aralarında bir bağlantı yoktur; olayın başlamasına neden olan ve kendisine uyarı kalktıktan sonra bile büyümeye devam eden anormal doku kitlesidir. Büyüme amaçsızdır ve otonomi gözlenir. Tümör gelişiminden sorumlu faktörler; proto-onkogenler (onkogenler), tümör süpresör genler, replikasyon hatalarını belirleyip onaran genler (mismatch repair genler) ve telomeraz genlerin aktivite kusurları ile genetik materyalde bir bozukluğa bağlı olmaksızın hatalı gen ekspresyonuna neden olan epigenetik değişikliklerdir.

2.3.1.1.Onkogenler (proto-onkogenler)

Onkogenler genomda aktif olarak bulunan protoonkogenlerin mutant formlarıdır. Bugüne kadar 80'den fazla protoonkogenin her birinin onkogenik potansiyel göstererek çeşitli kanser oluşumlarında rol aldığı saptanmıştır. Onkogenlerin kanser gelişimindeki rolü 60'lı yıllardan itibaren ortaya konmuştur ve kanserin moleküler temelleri hakkında ilk bulgular tümör virusları ile yapılan araştırmalar sonucunda sağlanmış, onkogen olarak adlandırılan belirli genlerin hücreleri transforme etme yetenekleri olduğu gösterilmiştir. Ancak böyle olsa bile insan kanserlerinin büyük çoğunluğu virusların etkisiyle değil radyasyon ya da kimyasal karsinogenez gibi başka nedenlerle ortaya çıkmaktadır.

2.3.1.2.Tümör Süpresör Genler (TSG)

Tıpkı onkogenler gibi tümör süpresör genler de hücre çoğalmasının düzenlenmesine katılan moleküller şifrelerdir. Fakat onkogenler ile tümör süpresör genlerin farkı; onkogenler aktif olduklarında kansere neden olurken, tümör genler ise çalışmadıklarında yani inaktif olduklarında kansere neden olur. Tümör süpresör genlerin esas fonksiyonu tümör oluşumunu engellemek değil, hücre büyümesini kontrol etmektir. Knudson'un çift mutasyon hipotezi de bu ifadeyi desteklemektedir. Bu teoriye göre herediter olan olgularda bir genetik değişiklik ebeveynlerden birinden gelir ve tüm somatik hücrelerde vardır. İkinci mutasyon ise ilk mutasyonu da taşıyan hücrelerin herhangi birinde meydana gelir. Sporadik vakalarda ise her iki mutasyon aynı tek hücrede somatik olarak vardır. Bu hipoteze en iyi örnek retinoblastom (*Rb*) geninde açıklanmıştır. Mutant kalıtsal *Rb* geni taşıyan (*Rb* lokusu için heterozigot olan) çocuk sağlıklı olmakla birlikte kanser gelişme riski yüksektir; mutant allel homozigot olduğu zaman retinoblastom ortaya çıkar. Kısacası TSG'ler, hücre döngüsünü kontrol ederler ve onarılamayan herhangi bir DNA hasarı olduğunda hücreyi apoptozise sevk eder. Tümör gelişimi için her iki allelde de mutasyon gereklidir; sağlam allelin kodladığı protein tümör gelişimini önlemek için yeterlidir.

2.3.1.2.1. Hücre Yüzeyinde Etkili Olan Tümör Süpresör Genler

Hücresinin büyüme ve davranışını düzenleyen hücre yüzeyinden salınan çeşitli moleküller vardır. En önemlileri Transforme edici büyüme faktör-beta (Transforming Growth Faktör=TGF- β), Kadherin ve Silinmiş kolon kanseri (Deleted Colon Cancer= *DCC*) geni sayılabilir. TGF-beta büyümeyi engelleyici faktördür. Kadherin hücresel adezyonu sağlar. *DCC* geni ise hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkisini sağlar ve çevreden aldığı uyarı ile hücrenin büyüme ve diferansiasyonunu düzenlemekle görevlidir. TGF-beta büyümeyi engelleyen genlerin transkripsiyonunu regüle eder. Buradaki mutasyon pek çok tümörde görülmektedir.

2.3.1.2.2. Uyarı İletim Sistemini Düzenleyen Tümör Süpresör Genler

Tümör süpresör genlerin etkili olduğu bir diğer alan büyüme sinyalini azaltmaktır. Nörofibromin 1 (*NF1*) geni ile Adenomatöz polipozis koli geni (*APC*) bu kategoridedir. *NF1*'de ve *APC*'de germline mutasyon beniyin tümörlerle ve karsinom öncülerıyla ilişkili bulunmuştur. Anormal *APC* geni vakaları ile doğan bir kişide bir mutant allel vardır ve yaşam sırasında da pek çok polip gelişmektedir. Tümör gelişimi için yeterli değildir; ikinci allelin de mutant olması gerekmektedir. Adenomdan kanser gelişimi de ek mutasyonlarla mümkündür. Sitoplazmada lokalize olan *APC* geninin ilişkili olduğu proteinlerden biri de beta katenindir. Beta katenin çekirdeğe ulaşarak transkripsiyon faktörlerini etkileyebilmektedir. *APC*'nin

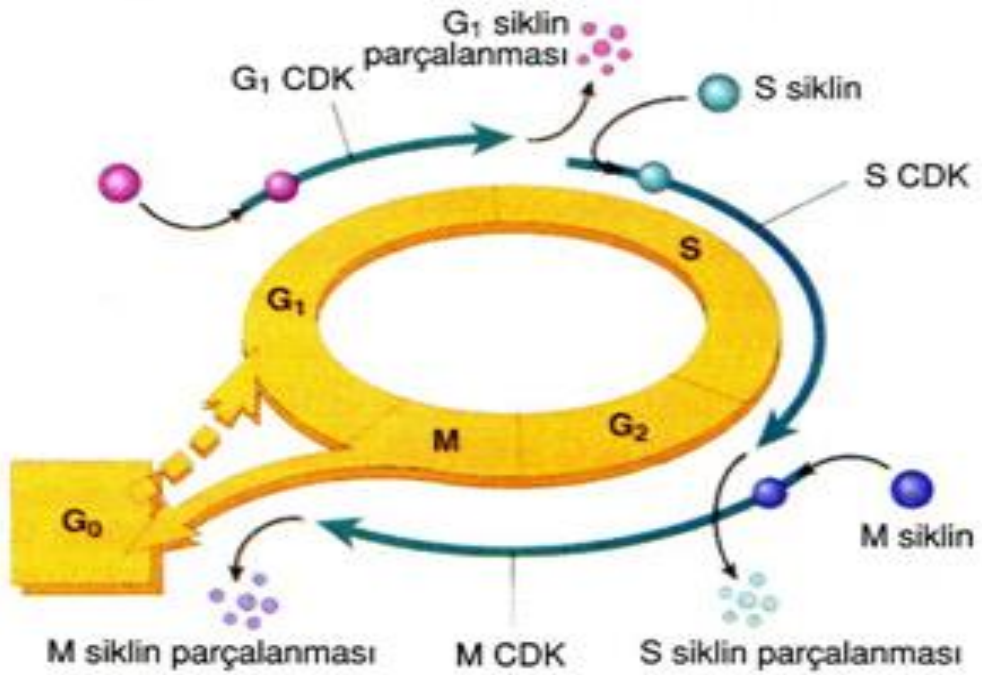
görevi katenini yıkmak ve sitoplazmada az bulunmasını sağlamaktır. *APC* gen inaktivasyonu veya kaybı katenin seviyesini artırır ve hücre proliferasyonu meydana gelir. Bazen Katenin mutasyonu da olabilmektedir. Mutant katenin *APC*'nin yıkıcı etkisine direnç göstererek yine hücre proliferasyonuna neden olmaktadır. Bu sebepten dolayı bazı kanser vakalarında *APC* geni aktif olsa bile tümör gelişimi görülmektedir. *NF1* geni de *APC* gibi davranmaktadır. Bir mutant alleli olan bireyde sayısız nörofibrom gelişmekte, 2. kopyasında mutasyon olunca veya ek mutasyonlarla maliyn tümör olabilmektedir (93).

2.3.1.2.3.Çekirdekte Etkili Olan Tümör Süpresör Genler

Çekirdeğe lokalize olan tümör süpresör genler *Rb*, *p53* ve *WT1*'dir.

- **Retinoblastom (*Rb*) Geni:** İlk tanınan tümör süpresör gendir. Hücre döngüsünde anahtar role sahiptir. Her hücre tipinde ifade edilir. Aktif ve inaktif formu vardır. Aktif formunda hücre siklusunda G1 fazından S fazına geçerken siklusu duraklatma görevi vardır. S fazına giren hücreler bölünmeye başlar. Retinoblastom geninin bu etkilerinde önemli rol oynayan bir faktör de E2F proteindir. E2F ile bağlı olan *Rb* proteini fosforile olunca E2F'yi serbest bırakır ve serbest kalan E2F transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile hücrenin S fazına girmesini sağlar. Retinoblastom proteini yokluğunda veya E2F'nin regülasyonu bozulduğunda hücre döngüsünün kontrol

mekanizması bozulur ve hücreler sürekli S fazına girer. Bununla birlikte *Rb* görev yaptığı sürece indirekt olarak onun fonksiyonunu düzenleyen ürünler olan siklinler, siklin bağımlı kinaz (SBK)'lar da ve SBK inhibitörlerinde gerçekleşen mutasyonlar da *Rb* kaybının yarattığı etkileri taklit ederek hücreye zarar verir. Sonuç olarak hücre döngüsü kontrolünün kaybı malign transformasyonun merkezidir ve siklusun 4 anahtarından en azından birinin mutasyonu gerekir. Bunlar *Rb*, siklinler, SBK'lar ve SBK inhibitörlerinden p16'dır.



Şekil 2.2. Hücre Siklusu: Siklin ve siklin bağımlı kinazlar ile kontrol edilen hücre siklusu $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$ evre sırası ile gerçekleşmektedir.

- **P53 Geni:** Tümörlerde en sık genetik değişikliğin gerçekleştiği gen adayıdır. Neredeyse %50'den fazla tümörde *p53* geninde mutasyon varlığı söz konusudur. Daha nadir olarak bazıları *p53*'ü kalıtsal şekilde mutant allel olarak bulundurmaktadır. Retinoblastom geni gibi bir mutant allelin kalıtımı kişinin maliyn tümör geliştirmesi için predispozandır çünkü sadece tek bir mutasyonun normal olan ikinci alleli bozması yeterlidir. *P53* geni çekirdekte lokalizedir ve diğler genlerin transkripsiyonunu kontrol etmek primer görevidir. Bu anlamda çok önemli bir rol üstlenmektedir. *Rb* aksine hücre siklusunun bekçiliğini yapmaz. *P53*'ün hücre siklusunu durdurmak için çağırılması ancak DNA hasarı, radyasyon, mutajenik kimyasallarla temas olduğunda söz konusudur. Genetik materyal zarar gördüğünde durağan *p53* harekete geçer. İki ana görevi vardır: Hücre siklusunu durdurmak ve apoptozisi uyarmak. *P53* ile indüklenen siklus durması G1 fazının geç döneminde ve *p53* bağımlı SBK inhibitörleri aracılığı ile gerçekleşir. SBK inhibitörlerinden bu işte görevli olanı p21'dir. Siklin/SBK kompleksini inhibe eden p21 proteini, S fazına girmek için gerekli olan Rb fosforilasyonunu engeller. DNA hasarı tamiri için zaman tanınır. DNA hasarı başarı ile tamir edilirse *p53* etkisi sonlanır. Eğer DNA hasarı tamir edilemezse apoptozisi uyaran genler görevlendirilir. *P53*

genin homozigot mutasyonu DNA'nın tamir edilememesine neden olarak malign transformasyona eğilim yaratır.

2.3.1.3.Heterozigosite Kaybı (Loss of Heterozygosity-LOH)

Tümör süpresör genlerden birinin sahip olduğu allelerden birisinde mutasyon varlığı sonucu genin işlevini yitirmesi fenotipe yansımayacaktır. Bu durumda diğer allel rutin görevi olan tümör baskılayıcı işlevini yerine getirmeye devam edecektir. Bu şekilde her iki allelin birbirinden farklı olması durumu "heterozigot" olarak adlandırılır. Daha sonraki aşamada sağlam allelin de kaybı ya da mutasyonu gelişmesi halinde heterozigot olma durumu kaybedilir. Bu olay heterozigosite kaybı (Loss of Heterozygosity= LOH / homozigotluğa indirgenme) olarak adlandırılmaktadır. Heterozigosite kaybı, tümör süpresör geninin fonksiyon görememesi sonucu tümör gelişiminin başlamasına veya ilerlemesine neden olmaktadır.

2.3.1.4.Hatalı Eşleşme Onarım Genleri (Mismatch Repair genleri- MMR)

Genetik bilgiyi taşıyarak nesilden nesile aktarılmasını sağlayan DNA üzerinde sürekli olarak hasar oluşmaktadır. Her bir insan hücresinin DNA'sında günde yaklaşık olarak 104 adet kodlanmayan veya yanlış kodlamaya neden olan hasar meydana gelmektedir (53). Replikasyon sırasında ortaya çıkabilecek hatalar ya da mutasyonlar MMR genleri tarafından fark edilerek onarılmaya çalışır. Ancak bu genlerin kendilerinde

mutasyon meydana gelmesi halinde daha sonra oluşacak mutasyonların onarımını engelleyerek tümör gelişimine yol açacaktır.

Hatalı eşleşme onarımında tümör gelişimi için her iki allelin de mutant olması gerekir. Bugüne kadar en çok araştırılmış MMR genleri, *MLH1*, *MSH2*, *PMS1* ve *PMS2*'dir. MMR genleri mutasyonlu olan tümörlerde her hücre bölünmesinde çok sayıda replikasyon hatası mevcuttur ve onarılamazlar. Genlerin bazı bölgelerinde kodlanmayan ve mikrosatellit olarak adlandırılan özel DNA dizileri vardır. Mikrosatellit yapıları canlı türlerinde ve bireyden bireye farklılık gösterebilir dahi bir bireyin tüm hücrelerinde aynıdır. Bu bölgeler MMR gen kusurlarından ilk etkilenen yerlerdir ve sonuçta mikrosatellit instabilitesi ortaya çıkar.

2.3.1.5.Telomeraz Aktivitesi

Kromozom uçlarında stabilizasyonu sağlayan özel DNA dizileri mevcuttur. Bu diziler özelleşmiş TTAGGG şeklinde yapılar olup telomer olarak adlandırılmaktadır. Görevleri kromozomların stabilizasyonunu sağlamak, uç uca füzyonu engellemek ve degradasyondan korumaktır. Hücre çoğaldıkça ve yaşlandıkça telomer boyunun kısaldığı görülür. Telomeraz enzimi, telomeraz geninin aktivasyonu ile sentezlenir ve telomerin sabit kalmasını sağlar.

2.3.1.6.Epigenetik Değişimler

Tümör oluşumuna neden faktörlerin en önemlilerinden biri, en son ve en çok gündemde olanı ise epigenetik değişimlerdir. Epigenetik değişiklikler genlerin sessizliğine neden olarak kanser oluşumunda rol oynamaktadır.

2.4.KANSER VE EPIGENETİK

Hücrenin DNA diziliminde mutasyonlar (nokta mutasyonları, delesyonlar, insersiyonlar, gen füzyonları, kromozomal tekrar düzenlenmeler) insan yaşamı boyunca olmakta ve bu değişiklikler birikmektedir. Mutasyonlar bazen iyi huylu olup somatik mozaizime, bazen de kanser gibi ölümcül hastalıklara sebep olabilmektedir (54-56). Başka bir deyişle kanser, sürekli gerçekleşen mutasyonların zaman içerisinde birikerek, karmaşık ve çok faktörlü mekanizmalar sonucunda normal hücrenin malign hücreye dönüşmesi şeklinde tanımlanmıştır (57).

Epigenetik mekanizmaların aydınlatılması ve kanser etiyolojisinde oynadıkları rolün keşfedilmesiyle bu klasik düşünce değişikliğe uğramıştır (58,59). İnsan DNA'sında 3,2 milyar nükleotid ve bunların da yaklaşık 25.000 gen taşıdığı bilinmektedir (60). Genetik bilgiyi taşıyan DNA, hücre çekirdeğinde histon proteinleriyle birleşerek kromatin yapısını oluşturmaktadır. Kromatinin en küçük fonksiyonel birimi olan nükleozomlar, 147 baz çiftinin ikişer molekül H2A, H2B, H3 ve H4 proteinlerinin etrafını yaklaşık 2 turla sarmasıyla oluşur. Kromatin

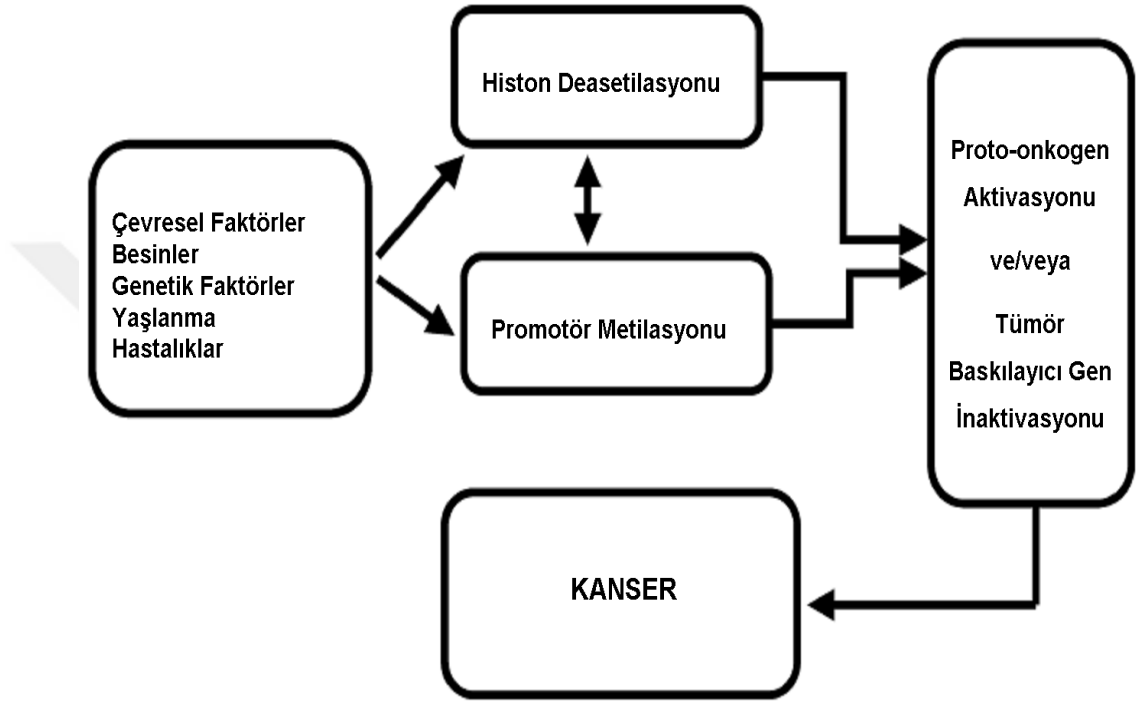
heterokromatin ve ökromatin olarak ikiye ayrılabilir. Heterokromatin daha yoğundur ve aktif olmayan genleri içerir. Ökromatin ise kısmen daha gevşektir ve aktif genleri içerirler (61). Kromatinin üç boyutlu yapısının ve üzerindeki değişikliklerin genlerin aktif ve pasif hale geçmesini etkilediği uzun yıllardan beri bilinmektedir. Gelişen teknoloji ve uygun ekipmanlar sayesinde son zamanlarda yapılan araştırmalarda histon proteinleri üzerinde olan bu posttranslasyonel değişikliklerin tahminlerden çok daha fazla sayıda ve çeşitlilikte olduğunun fark edilmesiyle, bu değişikliklerin fonksiyonu araştırmacıların merak konusu olmuştur.

1940 yılında Conrad Hal Waddington tarafından ortaya atılan “Epigenetik” terimi, fenotipin ortaya çıkmasını sağlayan genlerin ve bunların ürünleri arasındaki etkileşim olarak tanımlanmıştır (62). Günümüzde ise epigenetik, gen ifadesindeki değişikliklere neden olan mayoz ve mitoz bölünmeyle kalıtılabilen mekanizmaları inceleyen bilim dalı, başka bir deyişle gen ekspresyonuna bağlı kalıtsal bilgi olarak tanımlanmaktadır. Epigenetik mekanizmalar tersinirdir; birey kendi epigenetik profilini değiştirebilmekte ve oluşturduğu epigenetik profili bir sonraki nesle aktarabilmektedir (63,64). DNA diziliminde değişikliklere neden olan genotoksik mekanizmaların aksine epigenetik mekanizmalar DNA dizilimini değiştirmeden gen ifade seviyesini düzenlemektedir. Daha açıklayıcı olarak ifade edilirse bazı genlerin ifadesinin kontrolü epigenetiğin görevidir ve bunu DNA’nın temel yapısını değiştirerek değil, DNA ile bağlantılı olan kromatin proteinlerini ya da DNA’yı etkileyerek

gerçekleştirir. Yani epigenetik, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya ulaşmasını engelleyecek mekanik değişiklikler oluşturarak gen ifadesini kontrol eder. Organizmalarda meydana gelen X kromozomu inaktivasyonu, genomik baskılama, kromozomal kararsızlık, hücre farklılaşması ve gen ifadesi seviyesi gibi olaylar epigenetik mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir.

Bununla birlikte gıda, annenin davranışları gibi çevresel faktörler de epigenetik mekanizmaları kolayca etkileyebilmektedir (65). Epigenetik mekanizmalar, aynı ortamda büyüyen ve aynı genetik yapıya sahip iki bireyin nasıl farklı fenotiplere sahip olduğunu açıklar (66). DNA, çekirdek içerisinde histon proteinleri ile birlikte nükleozom birimlerini oluşturur ve böylece genetik materyal, düzenli bir biçimde paketlenerek kromatin yapısı meydana gelir. Kromatin yapısında kovalent ve kovalent olmayan modifikasyonlar gerçekleşir. Yüksek yapılı ökaryotların çoğunda ise DNA'nın kendi kendini kovalent olarak değiştirmesi mümkündür. Bunu sitozin bazlarının metilasyonu ile gerçekleştirir. Bu mekanizmaların hepsi birbiriyle iç içe geçmiş yolları içerir ve kromatin yapısındaki varyasyonları oluşturur. Bu nedenle tamamen aynı oldukları düşünülen tek yumurta ikizlerini birbirinden ayıran moleküler mekanizmalar epigenetiğin bir ürünüdür. Ayrıca kardeş kromatitlerin üzerindeki epigenetik farklılıkların gen ifade düzeylerine farklılıklara sebep olabileceği düşünülmektedir (67). Hatta epigenetik mekanizmaların, karsinogenezin ilk safhalarında yoğun olarak meydana geldiğinden kanser başlangıcında etkili olduğu

düşünülerek epigenetik temelli kanser tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi yeni hedef haline gelmiştir (68,69).



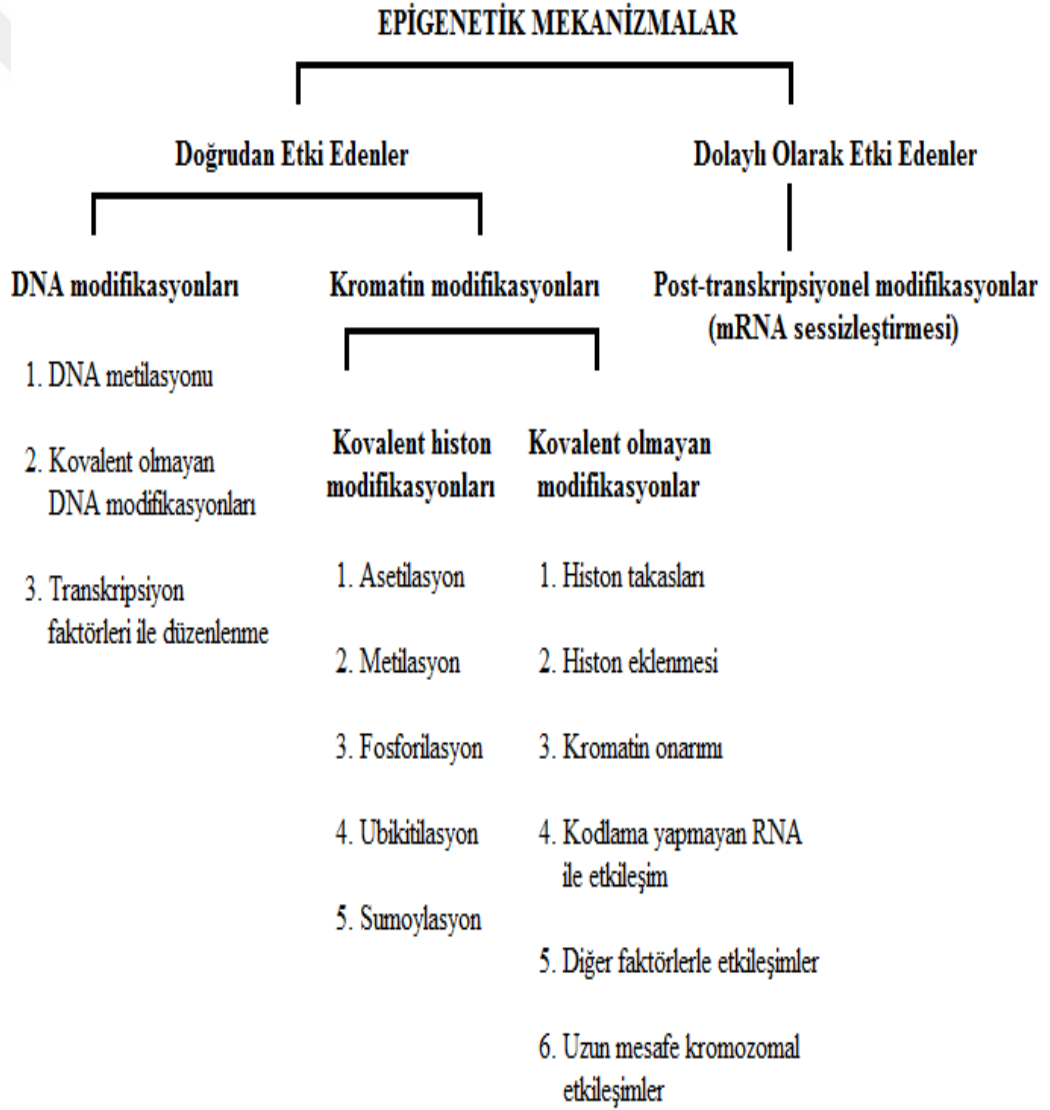
Şekil 2.3. Epigenetik mekanizmaların kanser gelişimindeki rolü (72)

2.4. KANSER VE GENETİK

Epigenetik mekanizmalar transkripsiyonel ve post transkripsiyonel olmak üzere iki temel mekanizma içerir. Transkripsiyonel mekanizmalar; histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu ile epigenetik regülasyonu genomik imprinting, X inaktivasyonu ve genomun yeniden programlanmasında görev almaktadır. Post-transkripsiyonel mekanizma; RNAi esas olarak transkripsiyon düzenleyicilerinin DNA'ya erişimini etkilerler. Fosforilasyon, ubiquitinasyon, yüksek mobilitateye sahip histon

olmayan (non-histon) proteinlerin varlığı ve asetilasyon ise; nükleoproteinler düzeyinde (histon-nonhiston) yapılan epigenetik modifikasyon mekanizmaları olup gen ekspresyonu farklılaşmasında rol alan en önemli mekanizmalardır.

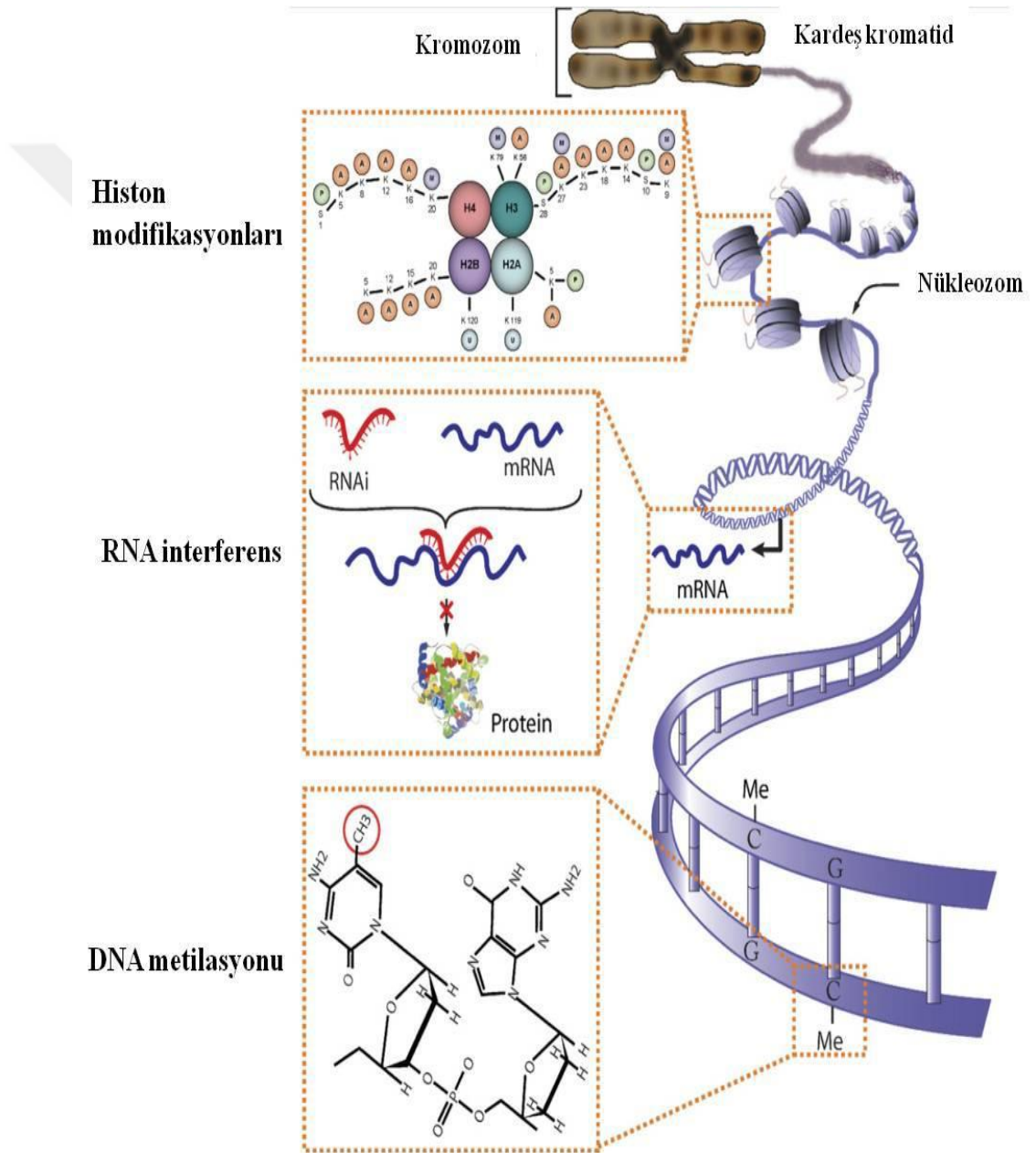
Ayrıntılı epigenetik mekanizmalar şekil 2.4’de belirtilmiştir.



Şekil 2.4. Epigenetik mekanizmalar

En önemli epigenetik mekanizmalar üç ana başlıkta toplanabilir

- DNA metilasyonu
- Histon modifikasyonları
- RNA ile indüklenen sessizleşme (RNA-induced silencing)



Şekil 2.5. Başlıca epigenetik mekanizmalar (70)

2.4.1. Epigenetik Mekanizmalar

2.4.1.1. Histon Modifikasyonları

- Histon asetilasyonu / deasetilasyonu
- Histon metilasyonu
- Serin veya treoninlerin fosforilasyonu
- Histon ubiquitinasyonu
- Glutamik asitlerin ADP-ribozilasyonu ve ubikitilasyon

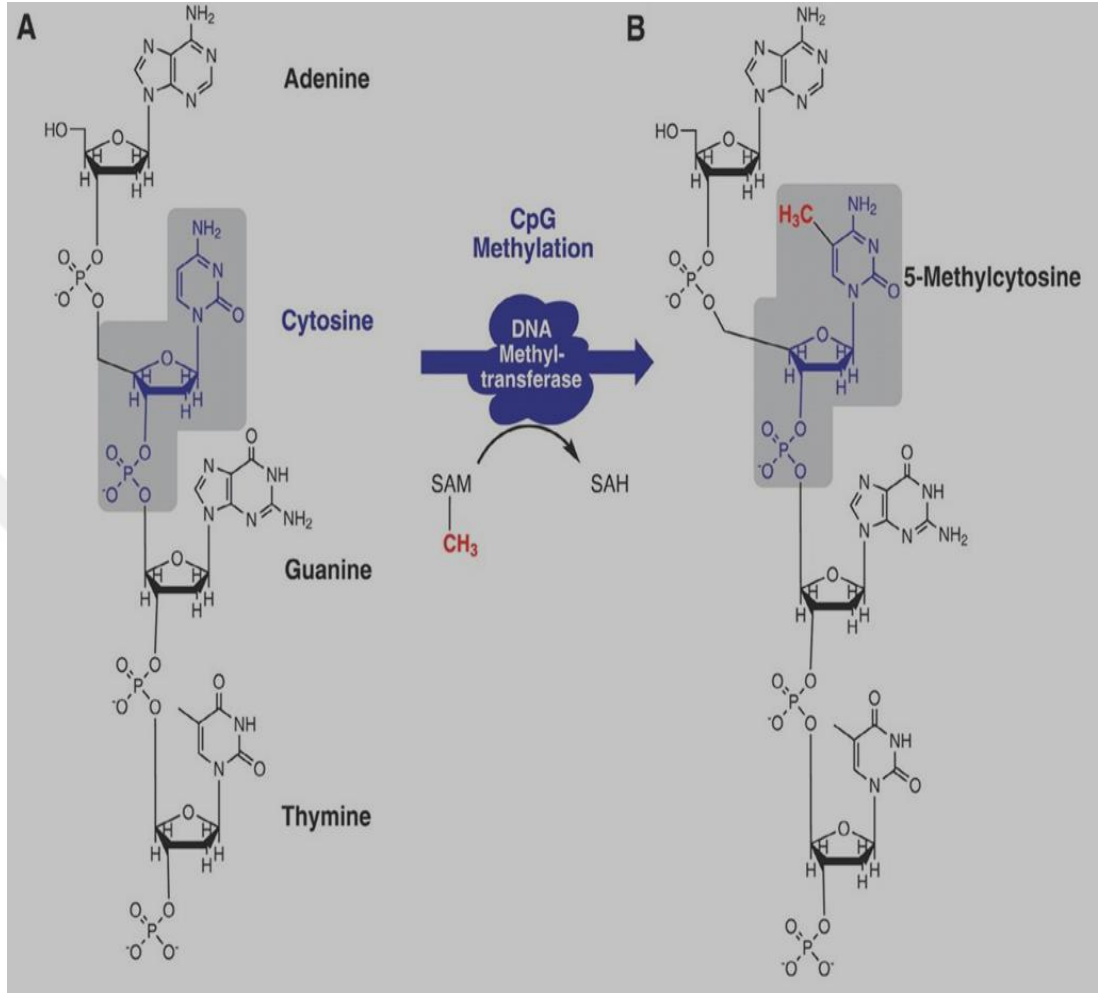
Tüm bu mekanizmalar, kromatin yapısında değişiklikler oluşturarak transkripsiyonu düzenleyici komplekslerin DNA'ya ulaşabilirliğini etkilerler. Ayrıca birçok histon modifikasyonu geri dönüşümlüdür ve modifikasyon seviyesi ile transkripsiyon seviyesi sıkı ilişki içerisinde. Beş adet olan histon proteinleri DNA'nın paketlenmesinde görev alırken, nükleozomdan dışarıya çıkıntı yapan bazik NH₂ (amino) terminal uçları bir takım post-translasyonel modifikasyonlara uğrayabilir. Bu modifikasyonlar arasında; histon asetil transferazlar tarafından asetillenme ve histon metil transferazlar tarafından metillenme yer almaktadır. Bu enzimler aracılığı ile kromatinin yapısı değiştirilirken gen regülasyonunda önemli rol oynarlar.

Asetilasyon ile histondaki pozitif yük (+) nötralize edilirken histonun DNA'ya olan elektrostatik etkileşimi zayıflatılır. Histon modifikasyonları kromatinin ökromatik ya da heterokromatik durumu gözetilerek gen aktivitesi ya da inaktivitesinde belirteç olarak kullanılabilir. H3 ve H4 histon lizin rezidülerinin asetilasyonu, aktif gen çalışması yani ökromatik durumla gösterilebilirken, deasetilasyon ise kromatinin daha sıkı paketlenildiği heterokromatik durum ile izah edilebilir. Histon lizin metilasyonu ise,

asetilasyonun tersine, hangi rezidüde olduğuna göre aktivasyon ya da inaktivasyonla sonuçlanabilir. Bu yolla, histonlardaki özgül modifikasyonlar, transkripsiyonel olarak aktif ve inaktif kromatinin belirlenmesinde bir çeşit belirteç olarak kullanılabilir. Histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ile birlikte çalışarak gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol alırlar. 5-metil sitozin varlığı, bulunduğu kromozom bölgesinde lokalize olan genlerin sessizleşmesine yol açar. Hücrede pek çok mekanizmanın düzenlenmesinde replikasyon, transkripsiyon, DNA tamir, rekombinasyon ve gen transpozisyonunda görev alır.

2.4.1.2. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, gen baskılanmasıyla bağlantılı olan bir mekanizmadır. Üzerinde en fazla çalışma yapılan ve ilk bulunan epigenetik değişiklik DNA metillenmesidir (71,72). DNA metilasyonu kovalent kimyasal bir modifikasyondur ve sitozin halkasının 5. pozisyonundaki karbon atomuna bir metil grubunun (-CH₃) eklenmesiyle gerçekleşir (73). (Şekil 2.6)



Şekil 2.6. CpG metilasyon mekanizması,

(A) Sitozin bazındaki nükleotidleri içeren CpG adacığı, (B) DNMT'lar tarafından katalizlenen CpG adası metilasyonu; S-adenozil metiyonin (SAM-CH₃)'den sitoz bazına metil grubu transferi.

Normalde DNA'da bulunan sitozin, en sık gözlenen mutasyon mekanizmalarından biri olan deaminasyon sonucu urasile dönüşür ve bir RNA bazı olması nedeniyle onarım mekanizmalarınca (urasil glikozilazlar) tanınarak onarılmaktadır. Buna karşılık metilsitozinin kendiliğinden deaminasyonu sonucu oluşan timin, normalde de DNA'da bulunan bir baz

olduğu için onarım mekanizmalarından kaçır. Bunun sonucu başlangıçta DNA çift zincirinde bulunan C-G ikilisi T-A ikilisine dönüşmesiyle sonuçlanır (74). Sitozin nükleotidinin metillenmesi, gen ifadesi ile direkt bağlı olup birçok ökaryot canlının gelişiminde, normal ve hastalık durumunda büyük rol oynar (75). CpG adacıkları ise genlerin promoter bölgelerinde bulunan, yaklaşık 500 baz çifti uzunluğunda ve %55'den fazla CG içeren, metilasyon oranı düşük olan korunmuş dizilerdir (76). DNA metilasyonu, genellikle genetik suskunluğa sebep olmaktadır (77). Kısaca CpG adalarının metilasyonu; gen delesyonu ya da inaktive edici mutasyonlara eşdeğer fonksiyon ile genin susturulmasına neden olur. Bu adacıkların belirli gruplarının metilasyonuna normal dokuda rastlansa da genellikle normal hücrelerde metillenmemiş halde bulunmaktadır.

Anormal DNA metilasyonun;

- hipometilasyon
- hipermetilasyon
- baskılama kaybı olmak üzere üç türü vardır.

Tarihsel olarak kanserlerde saptanan ilk epigenetik anomali hipometilasyondur. Hipometilasyon kromozomal instabiliteye ve bazı protoonkogenlerin ekspresyonunda artışa sebep olmaktadır (78). Hipometilasyon ve gen ekspresyonu arasındaki bu ters ilişki akciğer ve kolon kanserlerinde *k-ras* proto-onkogeninde gösterilmiştir (79). Tümörlerde sıklıkla hipometilasyon gözlenen diğer bölgeler ise retrotranspozonlar ve SINE ('short interspersed nucleotide elements') ve

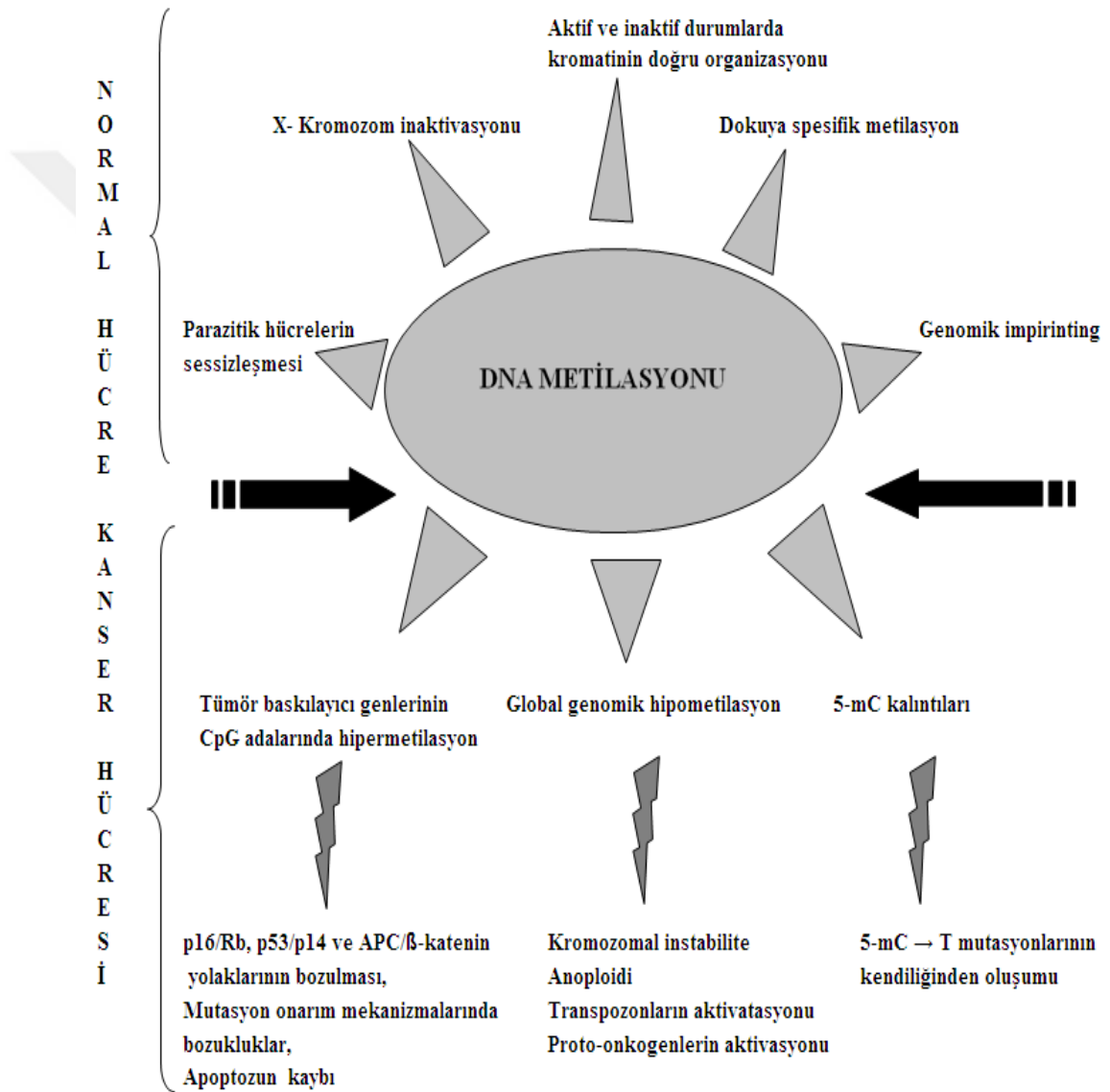
LINE-1 ('long interspersed nucleotide element type 1') tekrarlanan bölgelerdir. DNA metilasyonu DNA'nın sıkı bir şekilde paketlenmesinde rol oynamaktadır. Bu sıkı paketlenmeden dolayı örneğin, transpozonların genom içerisinde hareket etmeleri engellenmiş olmaktadır. Ancak, metilasyon kaybı ile DNA sıkı bir şekilde paketlenemeyeceğinden transpozonlar genomda rahatlıkla hareket ederek kromozomal instabiliteye neden olmaktadır. Ayrıca, DNA onarım genlerindeki anomaliler de kromozomal instabiliteye neden olmaktadır (80).

Promotor bölgelerde CpG adası hipermetilasyonu, normalde metillenmemiş olarak bulunan başta tümör baskılayıcı genler olmak üzere genomda hayati fonksiyonu olan pek çok genin (DNA tamir genleri, hücre siklus regülatörleri, apoptozis ve detoksifikasyonla ilişkili genler gibi) hipermetilasyon ile sessizleştirilerek fonksiyonlarının kaybına sebep olur. İlk olarak, 1993 yılında sporadik retinoblastomda retinoblastoma (*Rb*) (81) geninde hipermetilasyon gözlenmiş olup, bunu takiben *von Hippel Lindau* (*VHL*) (82), *CDNK2A* (*p16*) (82), ve özellikle son 20 yılda birçok gende hipermetilasyon olduğu kanser ile ilgili çalışmalarda gösterilmiştir. Kanserde hipermetilasyonda rol oynayan genler; hücre siklusunun regülasyonu (*p16*, *p15*, *Rb*, *p14*), DNA tamir sistemi (*BRCA1*, *MGMT* (*O* (6)-metilguanin-DNA metiltransferaz), apoptozis (ölümle ilişkili *protein kinaz-DAPK*), *transmembran segmenti-TMS1*), ilaç direnci, detoksifikasyon, angiogenez ve metastaz gibi olaylardan sorumludur. Bununla birlikte; *RASSF1A* ve *p16* gibi belirli genler bir çok çeşit kanserde

sıklıkla metile halde iken, diğer genler ise sadece bazı spesifik kanserlerde metiledir. Örneğin; nazofarengeal, baş-boyun, akciğer, mide, meme, serviks, renal karsinomlarda ve lenfomalarda *DLEC1* (84), özellikle B hücre lenfomalarında *FOXO1* (85). CpG adalarının metilasyonunun tümör gelişiminin özellikle erken dönemlerinde önemli olduğu, kanser için zemin hazırladığı, kanserin prognoz, ve yayılım hızına etki ettiği düşünülmektedir. Bu durum bir tümör göstergesi olarak metilasyonun önemini vurgulamaktadır. Yeni nesil Sekans (NGS-Next Generation Sequence) gibi yeni yöntemler kullanılarak yapılan araştırmalar sonucunda normalde metillenmemiş durumdaki CpG adacıklarının %5 ile %10'unun çeşitli kanser türlerinde anormal metillendiği gösterilmiştir (86).

Memelilerde DNA metilasyonunun görevini anlamak için model olarak fare kullanılmıştır. Bu modelde, primordial germ hücreleri, embriyonik kök hücreler ve blastosit hücrelerinin ölçülebilir DNA metilasyonu olmadan normal bir şekilde geliştikleri görülmüştür. Ancak kök hücreler farklılaşmaya başladığı dönemde DNA metilasyonu kusursuz gelişim için gerekli hale gelmektedir. Anne ya da babadan kalıtılan spesifik genlerden yalnız birinin ifade olması anlamına gelen gen damgalanması (genomic imprinting) de DNA metilasyonunu içermektedir. Sitozin metilasyonu aynı zamanda X-kromozom inaktivasyonundan da sorumludur. DNA metilasyonunun aynı zamanda yaşlanma sürecini de içerdiği düşünülmektedir. Konak memeli hücrelerinin genomuna birleştiren viral DNA'nın metilasyon tarafından inaktivasyona uğratılması, bu

yöntemin enfeksiyon ajanlarına karşı bir koruma mekanizması olarak görev aldığını göstermektedir. (87) DNA metilasyonunun normal ve kanserli hücrelerle ilişkisi Şekil 2.7’de özetlenmiştir.

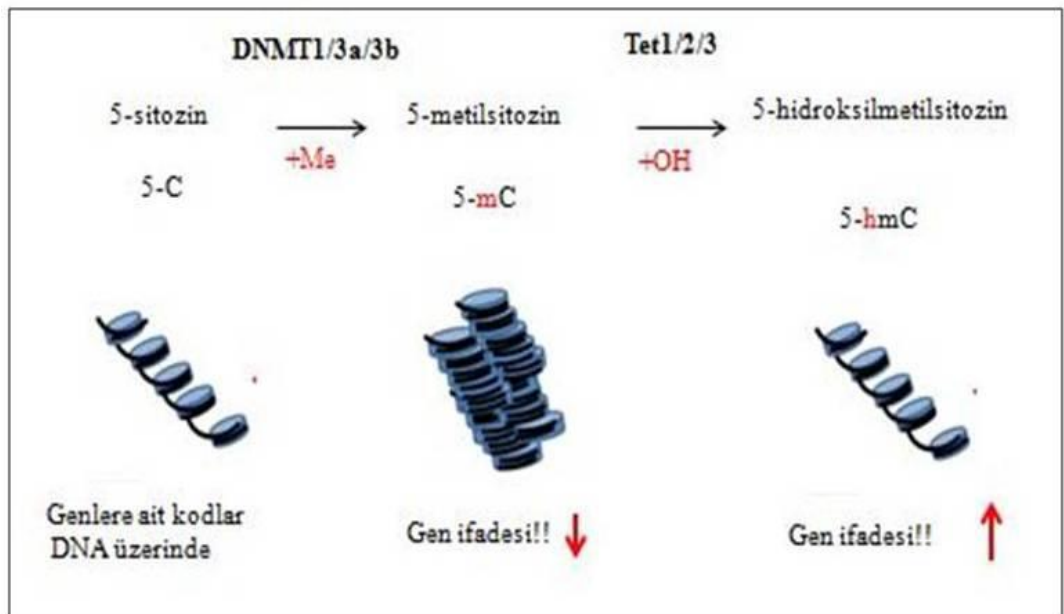


Şekil 2.7. Normal ve kanserli hücrelerin DNA metilasyonu ile ilişkisi (75).

Promoter bölgelerinde ve ilk ekzonlarda bulunan, %60-70 oranında guanin ve sitozince zengin olan CpG adaları genellikle tüm normal dokularda metile değil iken imprinting genler ve inaktif X kromozom genlerinde metile halde bulunur. Metillenmemiş durumunda bulunan CpG adalarındaki yeniden metillenmeler yaşlanma süreci ve kanser gibi bazı hastalıkların ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır. DNA metilasyonunda DNA metiltransferaz (DNMT) ve S-adenozil metiyonin (SAM) önemli rol oynamaktadır. DNMT'ler, SAM tarafından sağlanan metil grubunu sitozinin 5. konumundaki karbona aktaran enzimlerdir. Şimdiye kadar memelilerde 5 tip DNMT enzimi saptanmış olup; bunlar DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve onun izoformu olan DNMT3L'dir (88). DNMT1, gerçek metiltransferazlar olarak da bilinir ve replikasyon sırasında daha önce metillenmiş halde bulunan sitozin bazlarını tanıma ve metilasyonu yavru hücrelere aktarma yani metilasyonun korunmasını sağlama özelliğine sahiptir. DNMT1, yarı-metillenmiş DNA bölgelerine bağlanır. DNMT3a ve DNMT3b *de novo* metiltransferaz aktivitesi gösterir ve erken embriyogenez gelişim döneminde önemli rol oynarlar. Yarı-metillenmiş ve hiç metillenmemiş bölgelere bağlanarak metilasyonu gerçekleştirirler. DNMT3L ise; DNMT3a ve DNMT3b enzimleri ile ilişkili olup *de novo* DNA metilasyonunu indüklemektedir. DNMT2'nin diğer metil transferazlar gibi korunmuş olan metiltransferaz motifini taşıdığı gösterilmiş olup, ancak aktivitesi görülmemiştir (89).

SAM birçok metilasyon reaksiyonunun metil vericisidir. Artışı DNA metiltransferazları aktive eder, hipermetilasyonu tetikler ve global hipometilasyona karşı genomu korur (90). DNMT'lerin etkisiyle SAM'dan s-adenozil homosistein (SAH) oluşur; SAM/SAH oranı metilasyon durumunun metabolik göstergesi olup metilasyon potansiyeli olarak da ifade edilir (91).

DNA Metilasyonu ve Gen İfadesinin Düzenlenmesi: Bir genin metillenme derecesi ile ifade edilme derecesi arasında ters bir ilişki vardır. Yani, düşük derecedeki metilasyon yüksek oranda gen ifadesi ile ve yüksek derecedeki metilasyon ise düşük oranda gen ifadesi ile bağlantılıdır (Şekil 2.8). Hücre farklılaşmasıyla beraber farklı dokularda farklı genlerin ifade edilmesinin temelinde bu düzenlenme yatmaktadır. Ayrıca metilasyon dokuya özgüdür ve bir kere gerçekleşince o dokunun bütün hücrelerine aktarılır.



Şekil 2.8. Normal DNA metilasyonu ve gen ifadenmesi

2.4.1.3. RNA ile İndüklenen Sessizleşme (RNA-induced silencing)

RNA'ların, histon modifikasyonlarının ve DNA metilasyonunun başlaması için itici güç oluşturduğu, bu sayede heterokromatin bölgenin oluşumuna katkıda bulunarak kalıtsal olarak sessizleştirilmesini sağladığı düşünülmektedir (76).

2.4.2. Epigenetik Tedavi

Son yıllarda, insanlarda görülen çoğu hastalığın epigenetik temellerinin olduğunun anlaşılması üzerine, epigenetik hataların düzeltilmesi amacıyla yürütülen ilaç araştırma-geliştirme çalışmaları hız kazanmıştır. Tümörlerdeki epigenetik değişiklikler potansiyel olarak DNA metilasyon inhibitörleri veya histon deasetilasyon inhibitörleri ile geri döndürülebilmektedir. Böylelikle inaktif edilmiş olan TSG'lerin aktivasyonu sağlanacaktır. Bu nedenle tümör hücrelerinde görülen CpG adalarındaki metilasyon tedavi için hedef durumuna gelmiştir. DNA metilasyonunun kaldırılmasında iş gören 5-aza-2'-deoksisitidin (Decitabine, DAC) ve 5'-azasitidin ajanları DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri üzerinden etki etmektedir. Hematolojik tümörlerde DNA metilasyon inhibitörleri umut veren sonuçlar ortaya çıkartmıştır. Fakat bu yararların, tam olarak epigenom üzerindeki etkilerden mi kaynaklanıp kaynaklanmadığı henüz tam olarak belirlenemediği için temel araştırmaların yapılması gerekmektedir (76).

2.4.3. Metilasyon Yoluyla Etkisizleşerek Çocukluk Çağı Lenfomalarının Etyopatogenezinde Rol Oynadığı Öne Sürülen Tümör Baskılayıcı Genler

Normal lenfoid gelişim basamaklarındaki metilasyon örnekleri evrelendirmeye özgüdür (94). Normal metilasyon süreçleri doğrultusunda; lenfoid malignitelerdeki DNA onarımı, apoptozis ve hücre siklusunu düzenleyen genlerin metilasyon sırasında oluşan değişikliklerinden sorumlu aday genler gösterilmiştir (95-101). Geniş skala DNA metilasyon teknolojileri kullanımının artmasının bir sonucu olarak, lenfoid malignitelerin en az bir tipinde yüzlerce metilasyon değişiklikleri saptanmıştır. Bu genleri tanımlamak, kromatin mimarisinin ana yapısının geliştirilebilmesi ve devamının sağlanması açısından, malignite gelişiminden sorumlu olabilecek sinyal yollarının belirlenebilmesi ve biyobelirteç geliştirilebilmesi için önemlidir. *CDKN2A*, *PU.1 (SPI1)*, *PRDX2*, *DLEC1*, *FOXO1*, *KLF4*, *DAPK1* genlerinin metilasyon yolu ile epigenetik sessizleşmesinin etyopatogenezde rol aldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

2.4.3.1. *CDKN2A*

CDKN2A hücre siklus düzenlenmesinde tümör baskılayıcı gen olarak önemli rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Burkitt lenfoma patogenezinde bu genin metilasyonunun rol oynadığı öne sürülmüştür. Robaina ve ark. (105) yaptığı 51 vakalık bir çalışmada

olguların %72 sinde *CDKN2A* metilasyonu saptanmıştır. Aslında hücre siklusunda bir nevi tümör baskılayıcı genler gibi fonksiyon gören p15, p16, p21, p27 gibi CDK inhibitörlerinden bu yolak ile ilişkili olarak real-time PCR ile ölçülen p16INK4A ekspresyonu %41 olguda saptanmamıştır.

2.4.3.2. *PU1 (SPI1)*

Apopitoziste transkripsiyon faktörü olarak görev alan ve klasik HL'de ifadelenmesi azalmış olarak belirlenen *PU.1* geninin hipermetilasyonu ile hücre siklusunun G1 fazında duraklayamadığı, (G1 arrest) hemen S fazına girerek mevcut tümör supressör etkinliğinin kaybolduğuna dair bilgiler literatürde yayınlanmıştır (102).

2.4.3.3. *PRDX2*

Miyeloid hücrelerde büyüme inhibitörü olarak görev alan *PRDX2*'nin metilasyonu ve transkripsiyonel susturulması ilk olarak AML hastalarında tanımlanmasına rağmen klasik HL'da da gösterilmiştir. Hodgkin lenfoma hücre serilerinde *PRDX2* hipermetilasyonunun varlığı tümör baskılayıcı etkinliğin kaybolmasında önemli bir rol oynamaktadır (106).

2.4.3.4. *DLEC1*

Kromozomun 3p22-21.3 bölgesinde yer alan çok çeşitli kanserlerin erken moleküler mekanizmalarından sorumlu olan birçok gen

tanımlanmıştır. Wang ve ark. (84) 'da *DLEC1* geninin normal lenfoid dokularda net bir şekilde ifade edilmesine karşın HL ve NHL'de bu genin ifadenmesinde %70 oranında azalma veya tamamen sessizleşme saptanarak aktif olarak görev aldığı tümör baskılayıcı mekanizmalar devre dışı kalmıştır. Bu ekspresyon azlığı ya da yokluğu görülen hücre serilerinin çoğunun B hücrelerinden köken alan tip ve alt tipler olduğu belirtilmiştir.

2.4.3.5. *FOXO1*

Normal hücre siklusunda ve apoptozisde transkripsiyonel faktor olarak görev alan ve B hücrelerinde yüksek miktarda eksprese edilen *FOXO1* geninin hipermetilasyonunun da klasik HL'de ve primer mediastinal B hücreli lenfomada onkojenik transformasyonda rol oynadığı gösterilmiştir. Bu mekanizmalar; hücre siklusunda iletim yollarından JAK-STAT yolu üzerinden mitozun kontrolünde yer alan DNA bağlayıcı bir protein olan *MYC* onkogeninin aşırı aktive olması ve programlanmış hücre ölümünü inhibe eden genlerden *BCL-2* geninin yine aktive olması ile meydana gelmektedir (85).

2.4.3.6. *KLF4*

Guan ve ark. B hücreli lenfoma hücre serilerinde özellikle de klasik HL, diffüz büyük B hücreli lenfoma, Burkitt lenfoma ve foliküler lenfomada *KLF4* geninin metile olduğunu göstermişlerdir. Bu genin promoterinin hipermetilasyonunda ifadenmesinin azaldığı hatta kaybolduğu

belirtilmiştir. *KLF4*' ün transkripsiyonel aktivatörü olan *PU.1* transkripsiyon faktörü ve B hücre proliferasyonunun inhibisyonunda *FOXO1* transkripsiyon faktörünün ilişkisi düşünüldüğünde bu genin epigenetik olarak susturulmasının maliyn transformasyon gösteren hücrelerin apoptozis ve hücre siklus kontrol mekanizmalarından kaçmasına yol açarak B hücreli lenfomalarda, özellikle de klasik HL'de etkin rol oynadığı belirtilmiştir (103).

2.4.3.7. *DAPK1*

2000'li yıllardan itibaren *DAPK* geninin HDL'lerde hipermetilasyonu araştırma konusudur. *DAP-kinaz* (*DAPK* ya da *DAPK1*) serin-treonin kinaz olarak görev yapar ve p53'ün direk ve indirek en önemli substratlarından birisidir. Kristensen ve ark. diffüz büyük B hücreli lenfomalı 119 hastanın 102'sinde bu genin hipermetile olduğunu göstermişleridir. Çalışmalarında *DAPK* metilasyonunun istatiksel olarak anlamlı bir oranda genel sağ kalımı ve hastalığa özgü sağ kalımı azalttığını belirtmişlerdir. Böylelikle diffüz büyük B hücreli lenfomalı hastalarda *DAPK* metilasyonunun kötü prognoz kriteri olarak değerlendirilebileceği kanısına varılmıştır (104).

Çocuk ve adolesan lenfomalarında *CDKN2A*, *PU.1* (*SPI1*), *PRDX2*, *DLEC1*, *FOXO1*, *KLF4*, *DAPK1* genlerinin metilasyon yolu ile epigenetik sessizleşmesinin etyopatogeneizde rol aldığını gösteren çalışmalar olmakla birlikte, özgül bir lenfoma karakteristiğine sahip olan ülkemizde çocukluk çağı lenfomalarında epigenetik özellikler ve spesifik olarak tümör baskılayıcı genlerin metilasyonu üzerine yapılmış çalışma yoktur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HASTA VE KONTROL GRUPLARININ SEÇİMİ

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Onkoloji bölümünde 2000-2015 yılları arasında izlenen 42 HL, 15 NHL ve 41 maliyn olmayan lenf nodu proliferasyonu (kontrol grubu) olmak üzere, patolojik değerlendirmesi merkezimizde yapılan toplam 98 birey çalışmaya alındı. Hasta izleminde kullanılan dosyalar retrospektif olarak incelendi ve her hasta için, hastaların tanı yaşı, cinsiyeti, predispozan faktörler, histopatolojik tanısı, primer lokalizasyonu, hastalık evresi, hastalık alt evresi, risk grubu, tutulum yerleri, biyopsi yöntemi, kemoterapi protokolü, kemoterapi kür sayısı, radyoterapi varlığı, lokalizasyonu ve doz miktarı, izlem süresi, relaps varlığı ve zamanı, progresyon varlığı ve zamanı ve nihai durumları tespit edildi.

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim dalında parafin blokları halen mevcut olan ve yapılacak incelemeler için yeterli olduğu düşünülen 98 hastanın genetik çalışmaları Dışkapı Yıldırım Beyazıt EAH Genetik Tanı Merkezi'nde yapıldı. İki örnekte DNA izolasyonu dokunun yetersiz olması nedeniyle yapılamadı. Toplamda 41 HL, 15 NHL ve 40 maliyn olmayan kontrol grubu olmak üzere 96 birey çalışmalara dâhil edildi. Hasta dosyalarının incelenmesi ile tespit edilen 96 bireyde *CDKN2A*, *PU.1 (SPI1)*, *PRDX2*, *DLEC1*, *FOXO1*, *KLF4*, *DAPK1* genlerinin ekspresyon durumu ile hasta grubundan 30, kontrol grubundan 20 hastanın metilasyon çalışması gerçekleştirildi.

3.2. OLGULARIN İZLEMİ

Çalışmaya alınan tüm hasta ve kontrol grubunun takip ve tedavileri Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde yapılmıştır. Tanı için yapılan biyopsi işlemleri Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahi Anabilim Dalı tarafından yapılmıştır. Hastalara uygulanacak olan tedavi yaklaşımları pediatrik onkolog, çocuk cerrahı, radyasyon onkoloğu (HL hastaları için), patolog ve pediatrik radyologdan oluşan bir kurul tarafından kapsamlı bir şekilde tartışılarak karar verilmiştir. Relaps ya da progresif hastalık ya da tedavi protokollerinde değişiklik yapılması durumları da her bir hasta için ayrıntılı olarak bu kurulda tartışılmış ve karar verilmiştir. Hastaların takibinde görüntüleme çalışmaları, ilk 2 yılda 3 ayda bir, 2-5 yıl arası 6 ayda bir, sonraki yıllarda ise yıllık olarak değerlendirilmiştir.

3.3. ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kurumsal Araştırma Değerlendirme Komisyonu'na başvurularak; bu komisyonda iyi klinik uygulamalar klavuzu, biyoetik sözleşmesi, girişimsel olmayan klinik araştırmalar hakkında yönetmelikte değişiklik yapılmasına dair 11.03.2010 tarih ve 27518 sayılı yönetmelik hükümleri esas alınarak, etik açıdan uygun bulunduğu 14 mart 2016 tarih ve 25901600/125 sayılı karar ile onayı alınmıştır.

3.4. ARAŞTIRMA PROJESİ DESTEĞİ

Bu çalışma projesi Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP) Destek Programı tarafından desteklenmiştir. Proje desteği TPOG yönetim kurulu tarafından 01.06.2016 tarih ve 956 sayılı belge ile açıklanmıştır.

3.5. ÇALIŞMA PLANI VE YÖNTEMLERİ

3.5.1. DNA ve RNA İzolasyonu

Hasta ve kontrol vakalarının doku örneklerinin parafin bloklarından 5 mikron- luk kesit alınarak tümörlü alan işaretlenerek QIAamp FFPE DNA izolasyon kiti (QIAGEN, (QIAGEN, CAT NO:56404) ile DNA izolasyonu, miRNAasy FFPE RNA izolasyon kiti (QIAGEN, CAT NO:217504) ile de RNA izolasyonları yapıldı.

3.5.2. İzole Edilen DNA ve RNA ların Kontrolü

İzolasyonu gerçekleştirilen DNA ve RNA'ların kalitesi ve miktarları spektrofotometre ile (NanoDrop ND-1000) ölçümler yapılarak belirlendi. Ölçümleri gerçekleştirilen DNA ve RNA'lar ile ilgili hesaplamalar yapıldı ve DNA ve RNA miktarları 50ng/5µl olacak şekilde seyreltildi.

3.5.3. İzole Edilen RNA'nın cDNA'ya Çevrilmesi

Elde RNA örnekleri Transcriptor First Strand cDNA Synthesis KİT (ROCHE, CAT NO: 04 379 012 001) kullanılarak ve Thermal Cyclers (Applied Biosystems)'da; 65 °C 10 dk denatürasyon, 25°C 10 dk, 55°C 30 dk, 85°C 5 dk'lık reaksiyon programında cDNA'ya çevrildi.

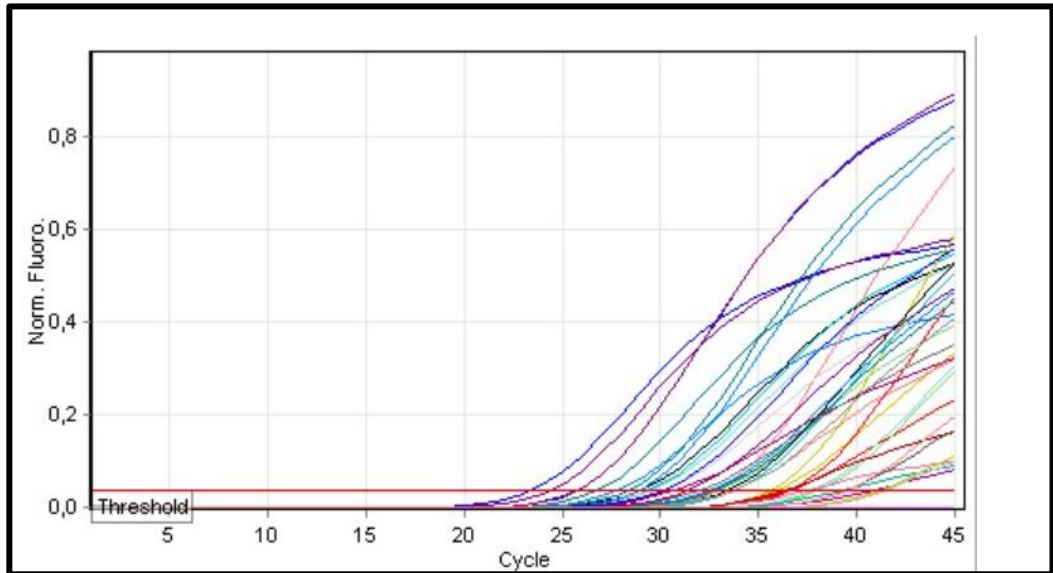
3.5.4. Gen Ekspresyon (RT- qPCR) Çalışması

Gen ekspresyonu çalışmasında çalışılacak genlere ait kullanılan primerler ve katalog bilgileri tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1. Gen Ekspresyon Çalışmasında Çalışılacak Genlere ait Primerler ve Katalog Bilgileri

GEN İSMİ	MARKA	LOT	ASSAY ID
DAPK1	Roche	28009	100335
PRDX2	Roche	28005	10076
PU1 (SPI1)	Roche	28007	111795
FOXO	Roche	28006	137191
CDKN2A	Roche	28010	101437
DLEC1	Roche	28012	148087
KLF4	Roche	28008	113486
ACTB (Kontrol Gen)	Roche	23658	143636

FastStart Essential DNA Probes Master (ROCHE, Catolog No:06402682001) ile; Rotor-Gene Q 2plex Platform (QIAGEN) cihazı ve 95°C'de 10dk, 95°C'de 30sn (35 cycle), 60°C'de 30sn (35 cycle), 72°C'de 30sn (35 cycle) termal cykler programı kullanılarak RT –qPCR çalışması yapıldı. Veriler Q-Rex Software programında analiz edildi. Gen ekspresyon çalışmasının Real Time PCR cihazındaki verilerinin grafiği şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Gen ekspresyon çalışmasının Real Time PCR cihazındaki verilerinin grafiği (30.cycle sonrası ekspresyon (-) olarak kabul edilmiştir).

3.5.5. Metilasyon Spesifik PCR Çalışması

Gen Ekspresyonu çalışmasının analiz sonuçları doğrultusunda doku kesitlerinden elde edilen DNA'lardan 50 örnek (30 hasta, 20 kontrol) seçilerek Metilasyon çalışması yapıldı.

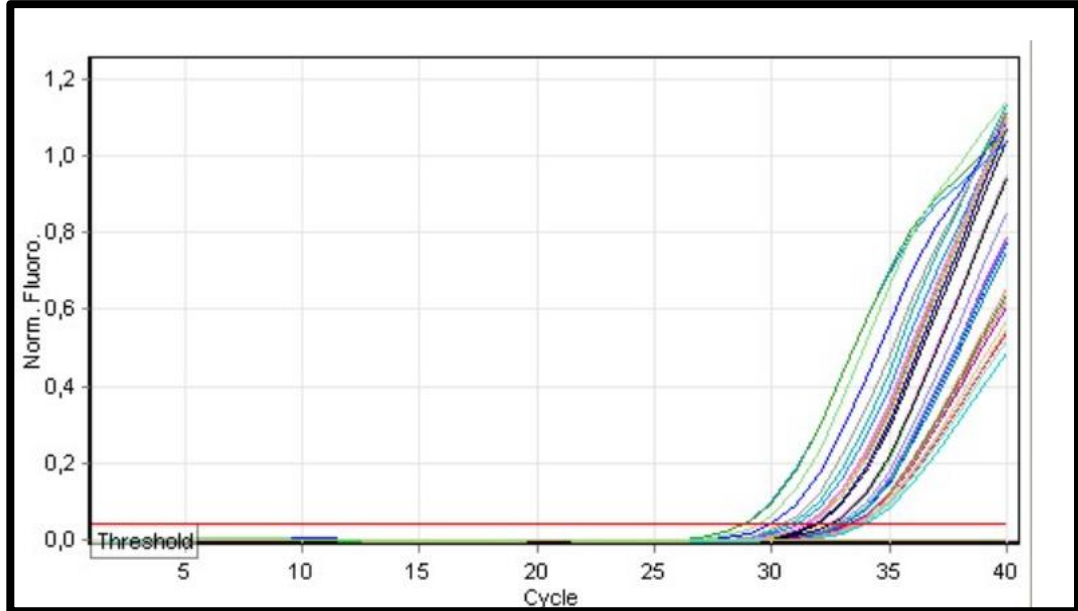
DNA 'ların G-C'den zengin bölgelerinin bisülfittenmesi işlemi için EZ DNA Methylation-Gold (ZYMO; Catalog no:D5005-D5006) kiti kullanılarak Thermal Cycler (Applied Biosystems) cihazında 98° C'de 10 dk, 64° C'de 2,5 saat, 4 °C'de 20 saat PCR yapıp spin kolon yöntemi ile DNA çalışmaya hazır hale getirildi.

Metilasyon spesifik PCR için seçilen genlerin promoter bölgeleri için dizayn edilen primerler (tablo 3.2.) ve Zymo Research (E2055) Taq qPCR premix kullanılarak Thermal Cycler (Applied Biosystems) cihazında; 95 °C'de 10dk 95 °C'de 30sn (35 cycle), 55 °C'de 30sn (35 cycle), 72 °C'de 30sn (35 cycle), 72 °C'de 7 dk.'lık programda PCR işlemi yapıldı. Sonuçlar Q-Rex Software (QIAGEN) analiz programında analiz edildi.

Tablo 3.2. Metilasyon Spesifik PCR için Seçilen Genlerin Promoter Bölgeleri için Dizayn Edilen Primerler

GEN İSMİ	MARKA	ÜRETİM LOT	ASSAY ID
DAPK1	Roche	20161017	25-26
PRDX2	Roche	20161017	9-10
PU1 (SPI1)	Roche	20161017	17-18
FOXO	Roche	20161017	13-14
CDKN2A	Roche	20161017	29-30
DLEC1	Roche	20161017	33-34
KLF4	Roche	20161017	21-22

Metilasyon spesifik PCR, sodyum bisüfitin DNA ile kimyasal tepkimesi sonucu metillenmemiş sitozinin urasile dönüşmesi reaksiyonu ve bunun ardından geleneksel PCR yapılması esasına dayalıdır. Metillenmiş sitozinler bu tepkimede urasile dönüşmezler, durumu merak edilen (Bizim çalışmamızda genlerin promoter bölgeleri) CpG konumu ile örtüşen primerler kullanılarak orasının metillenip metillenmediği anlaşılır (141). Metilasyon spesifik PCR çalışmasının Real Time PCR cihazındaki verilerinin grafiği şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Metilasyon spesifik PCR çalışmasının Real Time PCR cihazındaki verilerinin grafiği (30.cycle sonrası metilasyon (-) olarak kabul edilmiştir).

3.6. İSTATİKSEL ANALİZ

Tüm veriler SPSS 15.0 programı kullanılarak analiz edildi. Hasta gruplarının kendi arasında ve hasta gruplarının kontrol grubu ile olan karşılaştırılmasında hem ekspresyon hem de metilasyon oranı VAR/YOK şeklinde Pearson ki kare testi ile analiz edildi. Genel yaşam analizleri ve olaysız yaşam analizleri değerlendirilirken Kaplan-Meier yöntemi, ilgili genlerin, hastalık evresinin ve cinsiyetin genel ve olaysız yaşam üzerine etkisi Cox regresyon analizi yöntemi kullanıldı.

4.BULGULAR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Onkoloji bölümünde 2000-2015 yılları arasında takip edilen HL, NHL ve maliyn olmayan lenfadenopati tanısı alan hastalardan genetik analiz için yeterli örnek sağlanabilen 96 olgunun doku örnekleri çalışmaya alındı. Hasta ve kontrol gruplarının dağılımı ve klinik özellikleri Tablo 4.1’de, HL ve NHL gruplarında tutulum yerleri Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubunun yaş, cinsiyet, evre (HL, NHL), primer lokalizasyon ve tanı alt grupları

	HASTA			KONTROL
	HL n=41	NHL n=15	Toplam n=56	Toplam n=40
Yaş (ay) Mean ± SD Median	141.8±46.8 144.0	86.6±51.4 65	128.3±53.1 144	92.4±57.0 72
Cinsiyet E K	25 (%61) 16 (%39)	12 (%80) 3 (%20)	37 (%66) 19 (%34)	32 (%80) 8 (%20)
Evre I II III IV	4 (%9.8) 17 (%41.5) 8 (%19.6) 12 (%29.7)	11 (%73.3) 4 (%26.7)		
Primer lokalizasyon Servikal Mediasten Batin	27 (%65.9) 11 (%26.8) 1 (%2.8)	3 (%20) 4 (%26.7) 5 (%33.3)		30 (%75)
Tanı (alt grup)	HL-NS..20 HL-MS..12 HL-LR...5 NLPHL..3 HL-tanımlanmamış 1	BL..8 DBBHL..1 THL..6		RLN...16 LH...24

HL-NS: hodgkin lenfoma-noduler sklerozan, HL-MS: hodgkin lenfoma-miks selüler, HL-LR: hodgkin lenfoma-lenfosit zengin, NLPHL: nodüler lenfosit predominant hodgkin lenfoma, BL: burkitt lenfoma, DBBHL: diffüz büyük B hücreli lenfoma, THL: T hücreli lenfomalar, RLN: reaktif lenf nodu, LH: lenfoid hiperplaz

Tablo 4.2. HL ve NHL hastalarının tutulum bölgeleri

TUTULAN BÖLGELER (LN)	HL	NHL
servikal	6	2
mediasten	3	3
abdomen	0	5
aksiller	1	0
servikal+mediasten	15	1
servikal+abdomen	2	1
servikal+aksiller	0	0
servikal+abdomen	2	3
mediasten+aksiller	0	0
servikal+mediasten+abdomen	12	0
TOPLAM	41	15

Hastalık için olabilecek predispozan faktörlerine bakıldığında;

41 HL hastalarından 1 hastada fenitoin kullanımı, 1 hastada ailevi polipozis, 1 hastada da IgA eksikliği 1 hastada tbc temas öyküsü olup; geriye kalan hastalarda herhangi bir predispozan faktöre rastlanılmamıştır.

15 NHL hastalarından sadece 1'inde transplantasyona ikincil geliştiği görülmüştür.

Hastalara tanı koymak için kullanılan biyopsi yöntemleri incelendiğinde, HL grubunda 41 hastadan 33'ünde (%86.8) eksizyonel biyopsi ile tanı konulmuşken; NHL grubunda 15 hastadan 8'inde tru-cut biyopsi tekniği ile biyopsi yapıp tanı konulduğu görüldü.

Hastalıkların major tedavisi olan kemoterapi protokollerine bakıldığında; HL grubunda hastaların %97'sinde alterne COPP (Siklofosfamid, Vinkristin, Prokarbazin, Prednizon) + ABVD (Doksorubisin, Bleomisin, Vinblastin, Dakarbazin) protokol kullanılmışken, NHL grubunda %91 oranında BFM protokolü kullanıldığı gözlemlendi..

Verilen kemoterapi protokollerinin kür sayısı incelendiğinde; HL için tamamına yakını düşük evreli olan 16 hastada (%39) daha çok 4 kür, çoğunluğu yüksek evreden oluşan 19 hastada (%46) ise 6 kür kemoterapi kullanılmıştır. NHL hastalarında ise %60 oranında 6 kür kemoterapi kullanılmıştır. HL için kemoterapi ile birlikte radyoterapinin 41 hastanın 31'inde (%75) kullanıldığı saptanmıştır. Doz olarak bakıldığında ise 1950 ile 6120 cGy arasında doz verilmiş olup median doz 3576 cGy bulunmuştur. Verilen radyoterapi lokalizasyonlarına bakıldığında 31 hastanın 10'una (%32.3) boyun+mediasten lenf nodlarına verildiği, 9'una (%29) ise boyun+servikal lenf nodlarına verildiği görülmüştür.

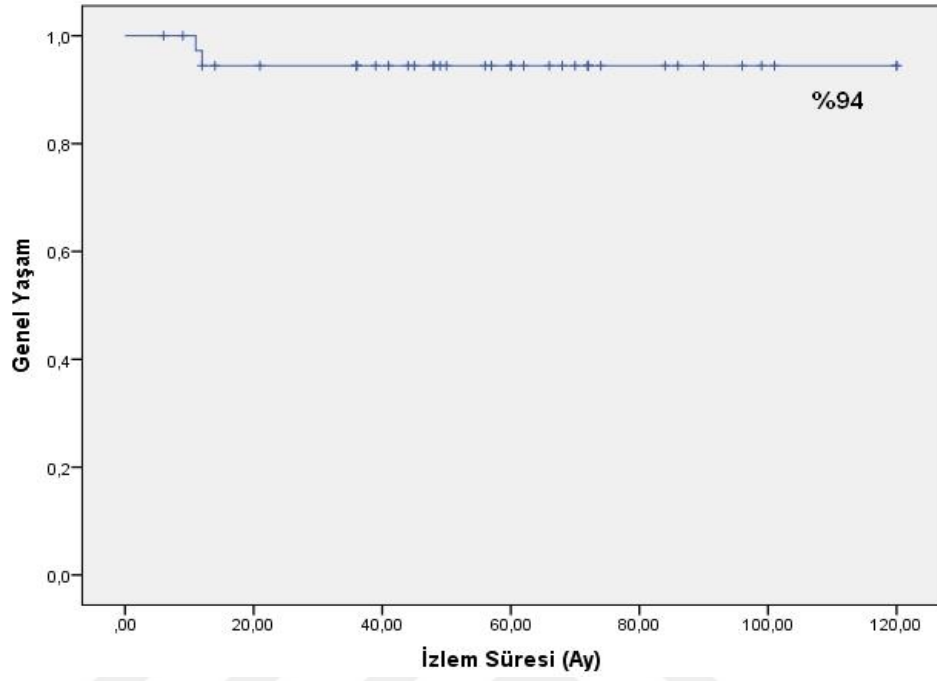
Relapslara bakıldığında ise HL hastalarından sadece 5'inde (%13) relaps olduğu, relaps zamanının tanı anından sonraki 12 ay ile 73 ay arasında değiştiği, median relaps süresinin 28 ay olduğu hesaplandı. Çalışmamıza dahil olan hiçbir NHL hastasında relaps izlenmedi. Tüm

hasta grubunda sadece 1 HL hastasında tedavinin 8. ayında progresyon izlendiği saptandı.

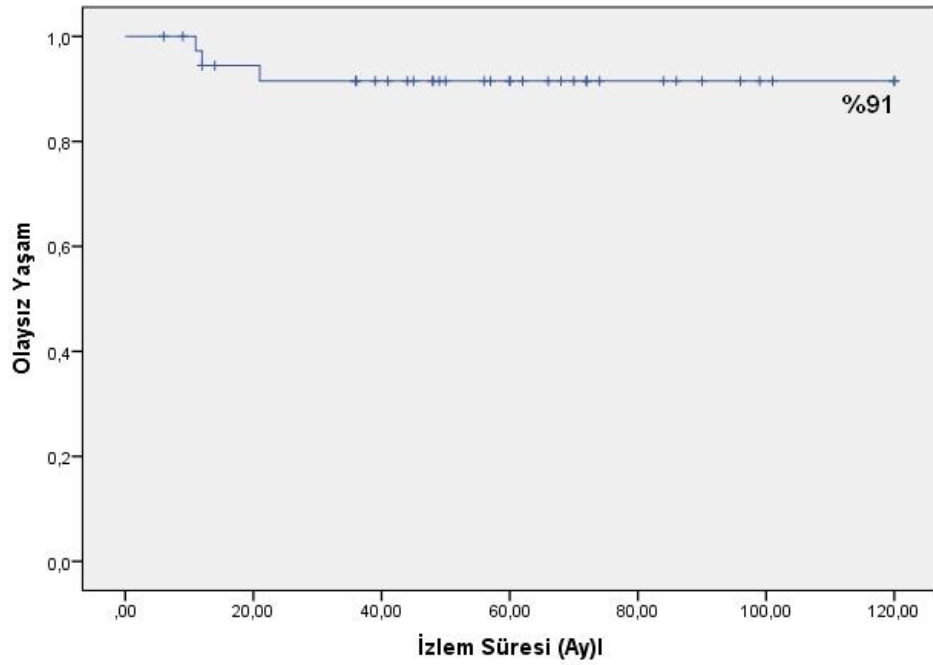
Son durum olarak hastalarımıza bakıldığında; HL hastalarından 1'nin tedavisinin devam ettiği, 27 hastanın remisyonda olduğu (%63), 2 hastanın eksitus olduğu ve nedenin sepsis olarak kayda geçmiştir. NHL hastalarının ise 11'nin remisyona girdiği (%76.6) 2 hastanın da biri sepsisten diğeri de progresif hastalık nedeniyle eksitus olduğu görülmüştür.

HL hastalarının genel yaşam ve olaysız yaşam grafikleri Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de; evrelere göre genel yaşam ve olaysız yaşam grafikleri Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir.

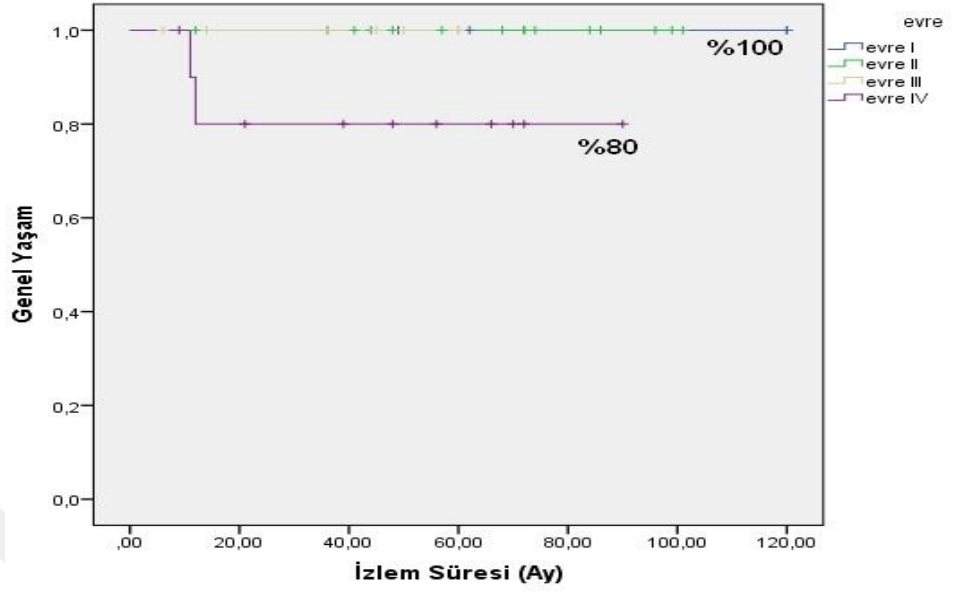
NHL hastalarının genel yaşam ve olaysız yaşam grafikleri Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de; evrelere göre genel yaşam ve olaysız yaşam grafikleri Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.



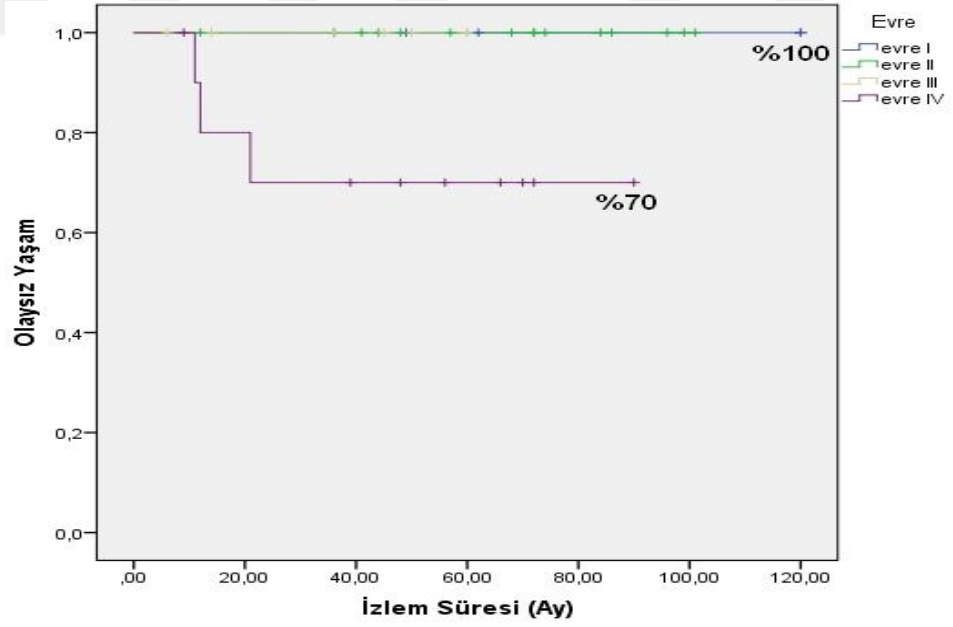
Şekil 4.3. Hodgkin lenfoma hastalarının genel yaşam analizi (n=41)



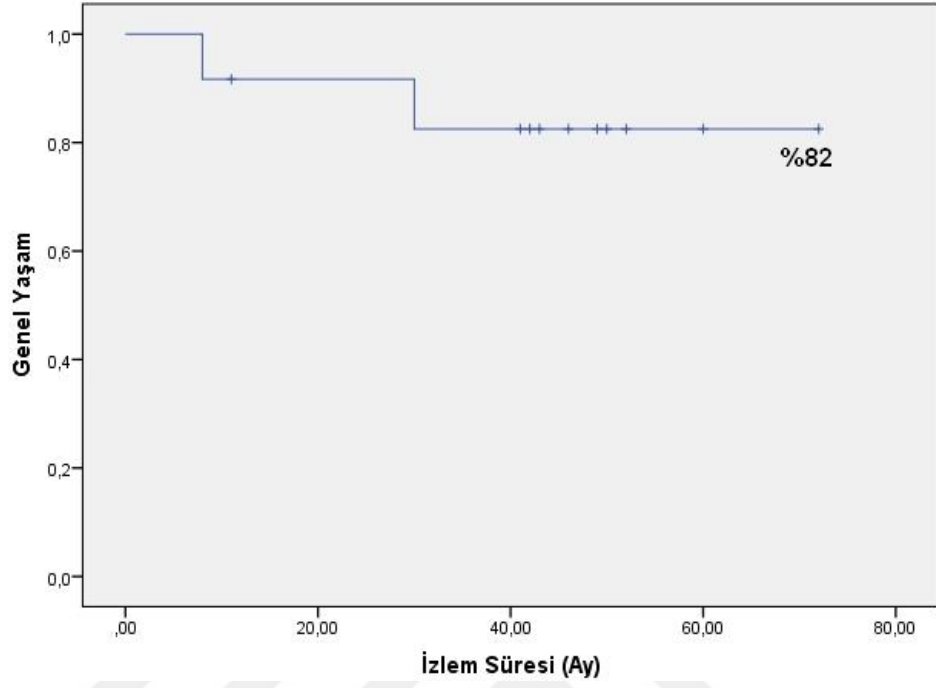
Şekil 4.4. Hodgkin lenfoma hastalarının olaysız yaşam analizi (n=41)



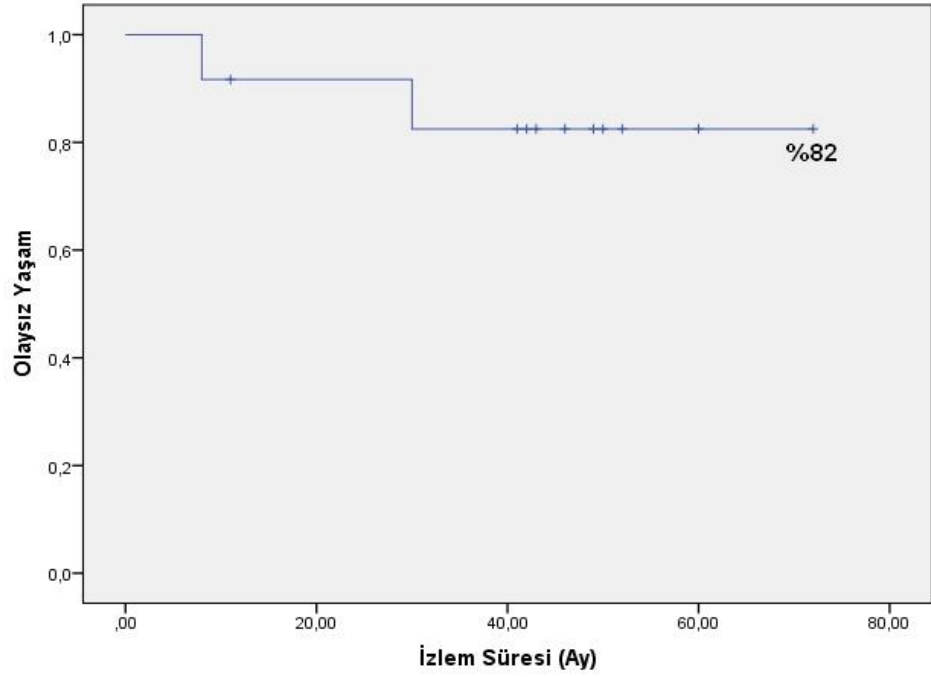
Şekil 4.5. Hodgkin lenfoma hastalarının evrelere göre genel yaşam analizi (n=41)



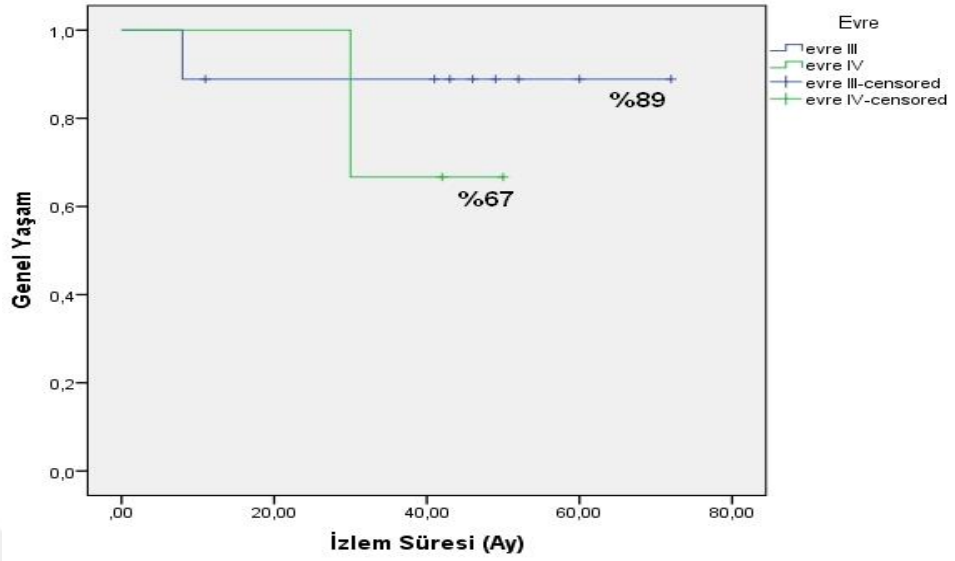
Şekil 4.6. Hodgkin lenfoma hastalarının evrelere göre olaysız yaşam analizi (n=41)



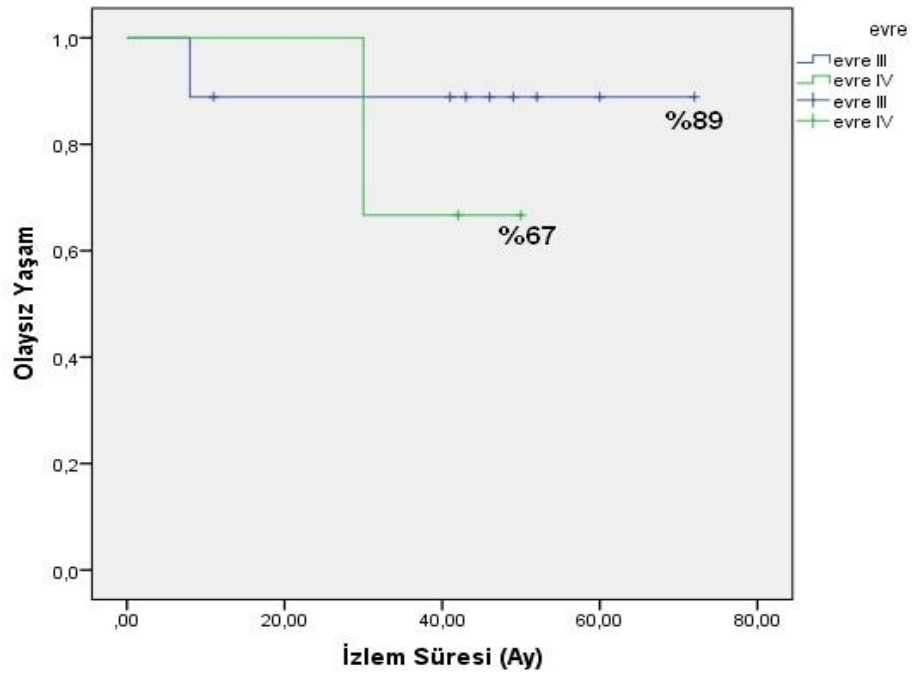
Şekil 4.7. Non- Hodgkin lenfoma hastalarının genel yaşam analizi (n=15)



Şekil 4.8. Non- Hodgkin lenfoma hastalarının olaysız yaşam analizi (n=15)



Şekil 4.9. Non- Hodgkin lenfoma hastalarının evrelere göre genel yaşam analizi (n=15)



Şekil 4.10. Non- Hodgkin lenfoma hastalarının evrelere göre olaysız yaşam analizi (n=15)

Çalışmamızda analiz ettiğimiz *CDKN2A*, *PU.1 (SPI1)*, *PRDX2*, *DLEC1*, *FOXO1*, *KLF4*, *DAPK1* tümör baskılayıcı genlerin ekspresyon ve metilasyon durumları şöyledir;

Tablo 4.3. Ekspresyon çalışılan hasta gruplarının dağılımı

Hasta ve Kontrol Gruplarının Dağılımı (ekspresyon çalışılanlar)		Hasta sayısı	Yüzde dağılımı (%)	Toplam (%)
Hodgkin Lenfoma	HL-LPN	3	3,1	41 (%42.7)
	HL-NS	20	20,8	
	HL-MS	12	12,5	
	HL-LR	5	5,2	
	HL-Tanımlanmamış	1	1	
Hodgkin Dışı Lenfoma	Burkitt	8	8.32	15 (%15,6)
	DBBHL	1	1.04	
	T Hücreli Lenfoma	6	6.24	
Kontrol	RLN	16	16,7	40 (%41.7)
	LH	24	25	
	TOPLAM	96	100,0	100 (%100)

İstatistiksel analize HL ve NHL alt grupları ve iki alt gruptan oluşan (RLN ve LH) kontrol grupları birleştirilerek devam edilmiştir. Her bir gen için HL (n=41), NHL (n=15) ve kontrol (n=40) olmak üzere toplam 96 örnek üzerinden karşılaştırma yapılmıştır.

Tablo 4.4. Gruplar içerisinde *CDKN2A* geni için bakılan ekspresyon durumu

GRUPLAR		<i>CDKN2A</i>		Toplam
		YOK	VAR	
HL	Hasta sayısı	40	1	41
	%	97,6%	2,4%	100%
NHL	Hasta sayısı	15	0	15
	%	100%	0%	100%
Kontrol	Hasta sayısı	34	6	40
	%	85%	15%	100%
Toplam	Hasta sayısı	89	7	96
	%	92,7%	7,3%	100,0%

Pearson ki kare testi ile istatistiksel analiz yapıldığında *CDKN2A* gen ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.05$). *CDKN2A* ekspresyon oranı HL, NHL ve kontrol gruplarının hepsinde benzer oranda düşük olarak saptandı.

Tablo 4.5. Gruplar içerisinde *SPI1* geni için bakılan ekspresyon durumu

GRUPLAR		<i>SPI1</i>		Toplam
		YOK	VAR	
HL	Hasta sayısı	30	11	41
	%	73,2%	26,8%	100%
NHL	Hasta sayısı	11	4	15
	%	73,3%	26,7%	100%
Kontrol	Hasta sayısı	2	38	40
	%	5%	95%	100%
Toplam	Hasta sayısı	43	53	96
	%	44,8%	55,2%	100,0%

Pearson ki kare testi ile istatistiksel analiz yapıldığında *SPI1* gen ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p=0.0001$). Hasta grupları arasında *SPI1* geni ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$), farkın gen ekspresyonunun hasta gruplarından anlamlı derecede yüksek olduğu (%95) kontrol grubundan kaynaklandığı saptandı.

Tablo 4.6. Gruplar içerisinde *PRDX2* geni için bakılan ekspresyon durumu

GRUPLAR		<i>PRDX2</i>		Toplam
		YOK	VAR	
HL	Hasta sayısı	33	8	41
	%	80,5%	19,5%	100%
NHL	Hasta sayısı	8	7	15
	%	53,3%	46,7%	100%
Kontrol	Hasta sayısı	2	38	40
	%	5%	95%	100%
Toplam	Hasta sayısı	43	53	96
	%	44,8%	55,2%	100,0%

Pearson ki kare testi ile istatistiksel analiz yapıldığında *PRDX2* gen ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p=0.0001$). Hasta grupları arasında *PRDX2* gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$), farkın gen ekspresyonunun hasta gruplarından anlamlı derecede yüksek olduğu (%95) kontrol grubundan kaynaklandığı saptandı.

Tablo 4.7. Gruplar içerisinde *DLEC1* geni için bakılan ekspresyon durumu

GRUPLAR		<i>DLEC1</i>		Toplam
		YOK	VAR	
HL	Hasta sayısı	38	3	41
	%	92,7%	7,3%	100%
NHL	Hasta sayısı	13	2	15
	%	86,7%	13,3%	100%
Kontrol	Hasta sayısı	3	37	40
	%	7,5%	92,5%	100%
Toplam	Hasta sayısı	54	42	96
	%	56,3%	43,8%	100,0%

Pearson ki kare testi ile istatistiksel analiz yapıldığında *DLEC1* gen ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). Hasta grupları arasında *DLEC1* gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$), farkın gen ekspresyonunun hasta gruplarından anlamlı derecede yüksek olduğu (%92,5) kontrol grubundan kaynaklandığı saptandı.

Tablo 4.8. Gruplar içerisinde *FOXO1* geni için bakılan ekspresyon durumu

GRUPLAR		<i>FOXO1</i>		Toplam
		YOK	VAR	
HL	Hasta sayısı	6	35	41
	%	14,6%	85,4%	100%
NHL	Hasta sayısı	0	15	15
	%	0%	100%	100%
Kontrol	Hasta sayısı	1	39	40
	%	7,5%	92,5%	100%
Toplam	Hasta sayısı	7	89	96
	%	7,3%	92,7%	100,0%

Pearson ki kare testi ile istatistiksel analiz yapıldığında *FOXO1* gen ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). *FOXO1* ekspresyon oranı HL, NHL ve kontrol gruplarının hepsinde benzer oranda yüksek olarak saptandı.

Tablo 4.9. Gruplar içerisinde *KLF4* geni için bakılan ekspresyon durumu

GRUPLAR		<i>KLF4</i>		Toplam
		YOK	VAR	
HL	Hasta sayısı	39	2	41
	%	95,1%	4,9%	100%
NHL	Hasta sayısı	14	1	15
	%	93,3%	6,7%	100%
Kontrol	Hasta sayısı	12	28	40
	%	30%	70%	100%
Toplam	Hasta sayısı	65	31	96
	%	67,7%	32,3%	100,0%

Pearson ki kare testi ile istatistiksel analiz yapıldığında *KLF4* gen ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). Hasta grupları arasında *KLF4* gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$), farkın gen ekspresyonunun hasta gruplarından anlamlı derecede yüksek olduğu (%70) kontrol grubundan kaynaklandığı saptandı.

Tablo 4.10. Gruplar içerisinde *DAPK1* geni için bakılan ekspresyon durumu

GRUPLAR		<i>DAPK1</i>		Toplam
		YOK	VAR	
HL	Hasta sayısı	15	26	41
	%	36,6%	63,4%	100%
NHL	Hasta sayısı	10	5	15
	%	66,7%	33,3%	100%
Kontrol	Hasta sayısı	4	36	40
	%	10%	90%	100%
Toplam	Hasta sayısı	29	67	96
	%	30,2%	69,8%	100,0%

Pearson ki kare testi ile istatistiksel analiz yapıldığında *DAPK1* gen ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). Hasta grupları arasında *DAPK1* gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$), farkın gen ekspresyonunun hasta gruplarından anlamlı derecede yüksek olduğu (%90) kontrol grubundan kaynaklandığı saptandı.

Özet olarak, hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında *SPI1*, *PRDX2*, *KLF4*, *DLEC1* *DAPK1* genlerinin kontrol gruba göre hastalarda istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az ekprese oldukları, *CDKNA2* ve *FOXO1* genlerinin ekspresyonu için ise hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmadığı görüldü.

Tablo 4.11. Hasta grupları içerisinde metilasyon çalışılma durumu

		Hasta sayısı	Yüzde dağılımı
Hasta dağılımı (metilasyon çalışılma)	METİLASYON ÇALIŞILAMAYANLAR	46	47,9
	METİLASYON ÇALIŞILANLAR	50	52,1
	TOPLAM	96	100,0

Çalışmaya dahil edilen toplam 96 hastadan 50'sinde tanesinde metilasyon analizi çalışılmıştır.

Tablo 4.12. Metilasyon çalışılan hasta gruplarının dağılımı

Hasta dağılımı		Hasta sayısı	Yüzde dağılımı
METİLASYON ÇALIŞILANLAR	HL-NS	10	20,0
	HL-MS	9	18,0
	NHL	11	22,0
	RLN	10	20,0
	LH	10	20,0
	TOPLAM	50	100,0

Metilasyon çalışılan hasta grubunun ise 30 tanesi hasta grubu 20 tanesi ise kontrol grubu olarak kendi içinde alt gruplara ayrılmıştır. Ekspresyon analizlerinde de olduğu gibi HL, NHL ve kontrol alt grupları kendi içlerinde birleştirilerek istatistiksel analiz yapılmıştır.

Tablo 4.13. Hasta ve kontrol grupları içerisinde *CDKN2A* geni için bakılan metilasyon durumu

GRUPLAR		<i>CDKN2A met</i>		Toplam
		YOK	VAR	
HL	Hasta sayısı	0	19	19
	%	0%	100%	100%
NHL	Hasta sayısı	0	11	15
	%	0%	100%	100%
Kontrol	Hasta sayısı	5	15	40
	%	25%	75%	100%
Toplam	Hasta sayısı	5	45	50
	%	10%	90%	100,0%

Hasta gruplarının hepsinde *CDKN2A* geni metilasyona uğradığından kontrol grubu ile istatistiksel analiz yapılmamakla birlikte, kontrol grubunda da yüksek oranda metilasyon saptanmıştır.

Tablo 4.14. Hasta ve kontrol grupları içerisinde *SPI1* geni için bakılan metilasyon durumu

GRUPLAR		<i>SPI1</i> met		Toplam
		YOK	VAR	
HL	Hasta sayısı	5	14	19
	%	26,3%	73,7%	100%
NHL	Hasta sayısı	3	8	15
	%	27,3%	72,7%	100%
Kontrol	Hasta sayısı	20	0	40
	%	100%	0%	100%
Toplam	Hasta sayısı	28	22	50
	%	56%	44%	100,0%

Pearson ki kare testi ile istatistiksel analiz yapıldığında *SPI1* gen metilasyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p=0.0001$). Hasta grupları arasında *SPI1* geni metilasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$), farkın gen metilasyonunun kontrol grubunda hiç bulunmamasından kaynaklandığı saptandı.

Tablo 4.15. Hasta ve kontrol grupları içerisinde PRDX2 geni için bakılan metilasyon durumu

GRUPLAR		PRDX2 met		Toplam
		YOK	VAR	
HL	Hasta sayısı	4	15	19
	%	21,1%	78,9%	100%
NHL	Hasta sayısı	6	5	11
	%	54,5%	45,5%	100%
Kontrol	Hasta sayısı	20	0	40
	%	100%	0%	100%
Toplam	Hasta sayısı	30	20	50
	%	60%	40%	100,0%

Pearson ki kare testi ile istatistiksel analiz yapıldığında PRDX2 gen metilasyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p=0.0001$). Hasta grupları arasında PRDX2 gen metilasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$), farkın gen metilasyonunun HL ve NHL gruplarında büyük oranda varlığına karşın kontrol grubunda hiç bulunmamasından kaynaklandığı saptandı.

Tablo 4.16. Hasta ve kontrol grupları içerisinde *DLEC1* geni için bakılan metilasyon durumu

GRUPLAR		<i>DLEC1</i> met		Toplam
		YOK	VAR	
HL	Hasta sayısı	1	18	19
	%	5,3%	94,7%	100%
NHL	Hasta sayısı	0	11	11
	%	54,5%	45,5%	100%
Kontrol	Hasta sayısı	19	1	40
	%	95%	5%	100%
Toplam	Hasta sayısı	30	20	50
	%	60%	40%	100,0%

Pearson ki kare testi ile istatistiksel analiz yapıldığında *DLEC1* gen metilasyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p=0.0001$). Hasta grupları arasında *DLEC1* gen metilasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$), farkın gen metilasyonunun HL ve NHL gruplarında 1 hasta dışında varlığına karşın kontrol grubunda yalnızca bir hastada bulunmasından kaynaklandığı saptandı.

Tablo 4.17. Hasta ve kontrol grupları içerisinde *FOXO1* geni için bakılan metilasyon durumu

GRUPLAR		FOXO1 met		Toplam
		YOK	VAR	
HL	Hasta sayısı	15	4	19
	%	78,9%	21,1%	100%
NHL	Hasta sayısı	11	0	11
	%	100%	0%	100%
Kontrol	Hasta sayısı	20	0	40
	%	100%	0%	100%
Toplam	Hasta sayısı	46	4	50
	%	92%	8%	100,0%

Pearson ki kare testi ile istatistiksel analiz yapıldığında *FOXO1* gen metilasyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p=0.029$). NHL grubunda hiç metilasyon bulunmaması nedeniyle HL ve NHL grupları istatistiksel analiz ile karşılaştırılamamakla birlikte, HL grubunda %21,1 oranında metilasyon saptanması, NHL ve kontrol gruplarında ise hiç metilasyon bulunmaması dikkat çekiciydi.

Tablo 4.18. Hasta ve kontrol grupları içerisinde *KLF4* geni için bakılan metilasyon durumu

GRUPLAR		<i>KLF4</i> met		Toplam
		YOK	VAR	
HL	Hasta sayısı	0	19	19
	%	0%	100%	100%
NHL	Hasta sayısı	0	11	11
	%	0%	100%	100%
Kontrol	Hasta sayısı	14	6	40
	%	70%	30%	100%
Toplam	Hasta sayısı	14	36	50
	%	28%	72%	100,0%

Pearson ki kare testi ile istatistiksel analiz yapıldığında *KLF4* gen metilasyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p=0.0001$). Hasta grupları arasında *KLF4* gen metilasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$), farkın HL ve HNL gruplarındaki hastalarının hepsinin metile olmasına karşın kontrol grubunda %30 oranında bulunmasından kaynaklandığı saptandı.

Tablo 4.19. Hasta ve kontrol grupları içerisinde *DAPK1* geni için bakılan metilasyon durumu

GRUPLAR		<i>DAPK1</i> met		Toplam
		YOK	VAR	
HL	Hasta sayısı	10	9	19
	%	52,6%	47,4%	100%
NHL	Hasta sayısı	3	8	11
	%	27,3%	72,7%	100%
Kontrol	Hasta sayısı	18	2	40
	%	90%	10%	100%
Toplam	Hasta sayısı	31	19	50
	%	62%	38%	100,0%

Pearson ki kare testi ile istatistiksel analiz yapıldığında *DAPK1* gen metilasyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p=0.002$). Hasta grupları arasında *DAPK1* gen metilasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$), farkın gen metilasyonunun kontrol grubunda yalnızca %10 oranında bulunmasından kaynaklandığı saptandı

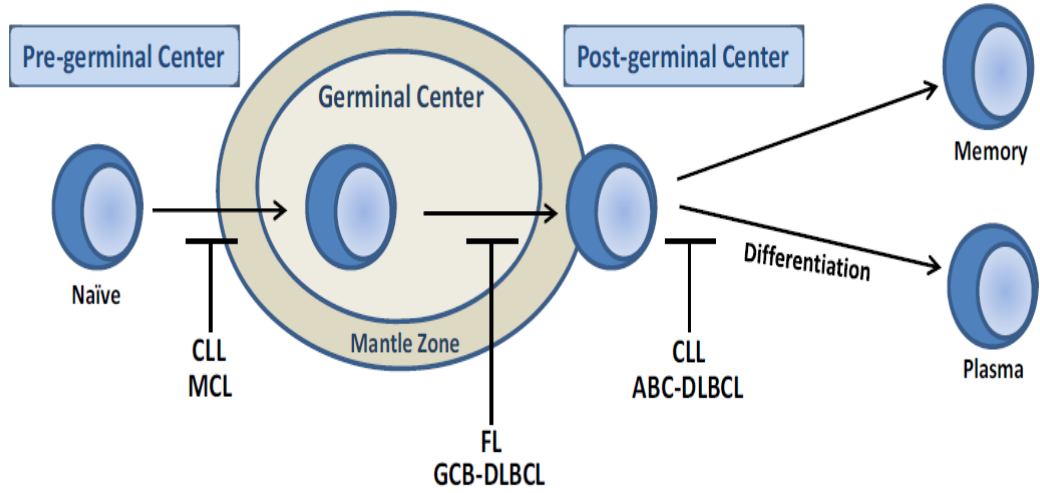
Özet olarak, *CDKN2A* ve *FOXO1* geni hariç çalışılan tüm genlerde metilasyon oranları HL ve NHL gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. *FOXO1*

geni HL'lı hastalarda NHL ve kontrol grubuna göre belirgin olarak yüksek bulundu.

Cox Regresyon analizi ile CDKNA2, SPI1, PRDX2, DLEC1, FOXO1, KLF4 ve DAPK1 gen ekspresyonlarının, evre ve cinsiyet ile birlikte hastaların genel yaşam ve olaysız yaşam oranları üzerine etkisi olmadığı görülmüştür. Metilasyonun, evre ve cinsiyet ile birlikte hastaların genel yaşam ve olaysız yaşam oranları üzerine etkisine bakıldığında; yalnızca DAPK1 metilasyonunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0,029$). Bununla birlikte, DAPK1 ekspresyonunun genel ve olaysız yaşam üzerine etkisinin olmaması nedeniyle bu bulgunun daha geniş serilerde doğrulanması gerekliliği düşünüldü.

5.TARTIŞMA

B hücreli maligniteler, normal hücre farklılaşmasının devam ettiği sırada tümör süpresör genlerin inaktivasyonu, onkogenlerin aktivasyonu, genomik kararsızlığa neden olan kromozomal translokasyonlar gibi çok çeşitli mekanizmalara epigenetik anormalliklerin de katkısı ile, B hücre gelişiminin ve farklılaşmasının duraklaması sonucunda ortaya çıkmaktadır (Şekil 5.1) (107).



Şekil 5.1. B hücre malignitelerinin oluşum mekanizması

MCL: mantle hücre lenfoma FL: foliküler lenfoma GCB-DLBCL: (kemosensitif) germinal merkez B hücre benzeri diffüz büyük B hücreli lenfoma ABC-DLBCL: (refrakter) aktive B hücre benzeri diffüz büyük B hücreli lenfoma (107)

21. yy başlarından beri moleküler genetiğin gelişmesinin hız kazanması ile DNA metilasyonu, post-traslasyonel histon modifikasyonları ve kodlanmayan RNA'nın anormal ekspresyonlarından oluşan epigenetik

mekanizmalar ayrı bir önem kazanmıştır. Literatürde epigenetik mekanizmaları baz alarak yapılan çalışmalar giderek hızla artmaktadır:

TET metilsitozin dioksigenaz 1 (*TET1*) enzimi metilasyonda önemli bir role sahip olup hipermetilasyonu *TET1* 'in ekspresyonunun azalmasına yol açarak ratlarda B hücreli lenfomaya neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle hematopoetik malignitelerde, özellikle de B hücreli lenfomalarda tümör süpresör rol oynadığı düşünülmektedir. Aynı zamanda ekspresyonunun azalması ile meme, kolorektal, cilt, mide ve akciğer kanserlerinde de adı geçmektedir. *TET1* defektif ratlarda periferik lenf nodlarında aşırı büyüme olduğu gösterilmiştir (108). *TET1* ile benzer aileden olan *TET2* geninin hipermetilasyonu ise foliküler lenfoma, mantle hücreli lenfoma ve Burkitt lenfomalı hastalarda gösterilmiştir (109).

Literatürde EBV ilişkili-ilişkisiz B hücre lenfomalarında da çalışmalar yapılmış, B hücre siklusunda önemli transkripsiyon faktörü ve aynı zamanda tümör süpresör olarak görev yaptığı düşünülen *BOB1*, *OCT2* ve *PU.1* genlerinin ekspresyonunda azalma olduğu tespit edilmiştir (110).

Avrupa'dan bildirilen bir makalede; özellikle klasik HL'lı hastalarda, önceki çalışmalarda reaktif lenf nodlarında, germinal merkez hücre çekirdeklerinde, mantle zon ve parafoliküler hücrelerde immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiş *ETS1* transkripsiyon faktörünün ifade edilmesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı bildirilmiştir. (111).

Tunus'tan Dhiab ve ark. (112) tarafından başka bir çalışmada ise; içerisinde 13 çocuk hastanın da olduğu toplam 53 HL'li hastanın parafin blokları ile çalışma yapılmıştır. Çalışmanın amacı öncesinde hücre siklus düzenlemesi ve apoptosiste görev alan *DAPK*, *RASSFA1 (DLEC1)*, *P16*; hücre farklılaşmasında görev alan *CDH1* ve *SHP1*; DNA onarım ve detoksifikasyonunda görev alan *MGMT* ve *GSTP1* genlerinin metilasyonunu PCR 10 kişilik reaktif lenf nodu tanısı alan grupla karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak, çalışılan 7 ayrı genin hepsinin belli oranlarda metile olduğu, kontrol grubunda ise metilasyon olmadığı görülmüştür. *P16*, *RASSFA1 (DLEC1)*, *CDH1*, *DAPK* genlerinin diğerlerine göre yüksek oranda metile olduğu saptanmıştır. Çalışmanın başka bir sonucu da *SHP1* geninin normalde bimodal insidans gösteren HL hastalarında (<15 yaş ve >54 yaş) yüksek oranda metile olduğudur. Ayrıca B semptomlu hastalarda bu genin yine anlamlı olarak yüksek oranda metile olduğu görülmüştür. *RASSFA1 (DLEC1)* geni için metilasyon ve ekspresyon durumlarının hastaların demografik verileri ile karşılaştırılması yapılmış ve kadın hastalarda istatistiksel olarak metilasyon durumu anlamlı bulunmuştur. *P16* genine bakıldığında daha çok ileri yaşlarda EBV-pozitif HL hastalarında metile olduğu saptanmıştır. Bir diğer önemli sonuç da literatürde metilasyonun prognostik belirteç olarak kullanılmasının en büyük adayı olarak belirtilen *DAPK* geninin hipermetile olduğu gösterilen hastaların kemo-rezistan olmasıdır (113). Bizim çalışmamızda da *DAPK* geni metilasyonun hastalık evresi ve cinsiyet ile birlikte yapılan Cox

regresyon analizi anlamlı çıkmıştır. Her ne kadar bu genin metilasyonunun genel yaşam ve olaysız yaşam üzerine etkili olmadığı çalışmamızda görölse de elde ettiğimiz veriyi literatür ile birleştirdiğimizde; mevcut durumun hasta sayılarımızın sınırlı olmasından kaynaklanabileceği ve bunun daha net açıklanabilmesi için daha büyük hasta sayısının kullanıldığı geniş kapsamlı bir çalışma yapılabileceği sonucuna eriştik.

Bethge ve ark. (114) B hücreli NHL'li 480 hastanın tümör örneklerinde, aralarında tümör süpresör genlerin de bulunduğu tedavi edilen hücre serilerinde ekspresyonu artmış olduğu bilinen 233 genin ekspresyonunun azaldığını saptamış ve B hücreli lenfomalı 37 hastanın %70'inde metile olduğu görülen 7 tane gen promoteri belirlemişlerdir. Metilasyon durumları oransal olarak birbirinden farklı olan bu genlerden özellikle *FZD8* ve *PPP1R14A*'nın hemen hemen tüm lenfoma tiplerinde yüksek oranda hipermetile olduğu dikkati çekmiştir. Yazarlar, bu genlerin B hücreli lenfomalarda biyobelirteç olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Epigenetik mekanizmaların açıklığa kavuşması ve yeni teknolojilerin geliştirilmesi ile anormal epigenetik olayları engellemek tedavi seçeneği olarak gündeme gelmiştir. Bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda üç farklı molekül karşımıza çıkmaktadır.

- HDAC (histon deasetilaz) inhibitörleri
- DNA metiltransferaz inhibitörleri (DNMTi)
- Histon metiltransferaz inhibitörleri (EZH2 gibi)

Literatüre baktığımızda HDAC inhibitörlerinin (vorinostat, romidepsin, belinostat, panobinostat) hücre siklus kontrolü, apoptozis, hücre farklılaşması ve gen ekspresyonunda düzenleyici rol aldığı belirlenmiştir. Vorinostatın foliküler ve marginal zon lenfoma tiplerinde etkili olduğu görülmüştür. FDA tarafından onay alınan romidepsin ise kutanöz T hücreli lenfoma ve periferik T hücreli lenfomada kullanılmaktadır. Benzer şekilde benostat da periferik T hücreli lenfomada kullanılmaktadır. Panobinostatın ise multiple myelomda kullanıldığı gösterilen yayınlar mevcuttur. HDAC inhibitörlerinin kombine tedavi olarak kullanılması önerilmektedir. DNA metiltransferaz inhibitörlerinden azasitidin ve desitabin nükleosid analogları olup DNA metiltransferazları inhibe ederek hipometilasyonda rol oynamaktadırlar. Bu iki ilaç da FDA tarafından myelodisplastik sendrom tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır ve AML ve lenfoma tedavisinde kullanılması için faz çalışmaları devam etmektedir. Bu tedavi rejimleri için *CDKN2A* geni de dâhil olmak üzere faz çalışmaları hızla devam etmektedir (113).

Ayrıca DNA metilasyonundan sorumlu olan DNA metiltransferaz 3A ve 3B (DNMT3A ve DNMT3B) 'lerin diffüz büyük B hücreli lenfomalarda aşırı ekprese edildiği gösterilmiştir (107). Bu enzimlerin de inhibe edilebileceği tartışılmaktadır.

Tümör süpresör genlerin baskılanması ile ilişkili histon metiltransferaz adlı enzimin rol aldığı AML hastalarında gösterilmiştir. Diffüz büyük B hücreli lenfoma ve foliküler lenfomada da rol aldığı

gösterilen bu enzimin inhibe edilmesi ile güzel sonuçlar alınabileceği tartışılmaktadır (113).

Kanser ve genetik ilişkisi, yakın geçmişteki teknolojik gelişmelerle birlikte epigenetik mekanizmaların daha iyi anlaşılması ile her geçen gün daha da ön plana çıkmaktadır. Genel olarak kanser, hücre proliferasyonu ve apoptozis arasındaki dengenin bozulması ile ortaya çıkmaktadır. Moleküler genetiğin yöntemlerin katkısı ile bu dengede rol alan, özellikle de tümör süpresör gen olarak görev yapan transkripsiyon faktörlerinin varlığı, özellikle erişkin hastalarda yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu konuda çocukluk çağında yapılan çalışmalar daha azdır ve lenfoma prevalansının yüksek olduğu ülkemize özgü genetik ve epigenetik özellikleri inceleyen araştırmalar kısıtlı sayıdadır. Literatürde B hücreli lenfomaların oluşum mekanizmalarından sorumlu olduğu öne sürülen ve özellikle erişkin tip lenfomalarda hücre döngüsünde ve apoptozisde transkripsiyon faktörü olarak görev aldığı bilinen *CDKN2A*, *PU.1 (SPI1)*, *PRDX2*, *DLEC1*, *FOXO1*, *KLF4*, *DAPK1* genlerinin, çocukluk çağı lenfomalarının etiyopatogenezinde de rol oynaması olasıdır.

CDKN2A geninin birçok kanserin yanı sıra B hücreli NHL'larda da inaktive edildiği gösterilmiştir. *CDKN2A* hücre siklusunda kritik role sahip CDK4 ve CDK6'yı inhibe ederek hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçişini durduran bir tümör süpresör gendir (115-116). Ayrıca *CDKN2A*'nın hücre serilerinde ve Burkitt lenfoma örneklerinde yine hücre döngüsünde görevli p16'yı inaktive ettiği de gösterilmiştir (117-118-119). Öte yandan

Burkitt lenfoma etiyopatogenezinde rol oynayan EBV'nin EBNA3A ve EBNA3c proteinlerinin *CDKN2A* metilasyonunu indüklediği gösterilmiştir (120-121). *CDKN2A* hipermetilasyonu olan NHL'lerin daha agresif seyir gösterdiği de öne sürülmüştür (122).

Literatürde BL hücre serilerinden ve BL örneklerinden oluşan çalışmalara bakıldığında *CDKN2A* geninin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde metile olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada *CDKN2A* geninin direk ekspresyonuna bakılmamış olup, hücre döngüsünde yakın işbirliği içinde çalıştıkları p16 ekspresyonu çalışılmıştır. Sadece 1/6 tümörde ekprese edildiği bunların da %5'lik bir kısmının metile olduğu görülmüştür. *CDKN2A* metilasyonunun 5 yıllık genel sağkalım üzerine etkisi ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (123).

Bizim çalışmamızda ise *CDKN2A* geninin tüm hasta grupları içerisinde sadece HL'li 1 hastada ekprese olmasına karşın, kontrol grubunda da yalnızca %15 oranında ekprese olması nedeniyle hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

CDKN2A geninin metilasyonuna bakıldığında ise; metilasyon çalışılan tüm hasta gruplarında metile olduğu, kontrol grubu ile hasta gruplar karşılaştırıldığında ise kontrol grubunun sadece %25'inde metile olmadığı görülmüştür.

Bu veriler doğrultusunda *CDKN2A* geninin tüm hasta gruplarında metile olmasına rağmen hasta ve kontrol grubunun her ikisinde de

ekprese olmaması, *CDKN2A* geninin hücre proliferasyonunda önemli bir görevi olduğu ve kontrol grubunda reaktif lenf nodu ve lenfoid hiperplazilerden oluştuğu düşünüldüğünde bu genin sadece tümör oluşumu ile ilgili olmadığı kanaatine varılmıştır. *CDKN2A* geninin maliyn olan ya da olmayan tüm lenf nodu proliferasyonlarında ekspresyonunun azaldığını ve maliyniteye özgü olmayabileceğini düşündürmektedir.

Çalıştığımız diğer bir gen olan *SPI1* (*PU.1*) ile ilgili literatüre baktığımızda birçok çalışmada lenfoid ve miyeloid hücre farklılaşmasında transkripsiyon faktörü olarak göze çarpan bir tümör süpresör gendir (124-125).

Ratlarda yapılan başka bir çalışmada *SPI1* geni ekspresyonu azaltıldığında (down-regulation), %20 oranında ratlarda AML ve B hücreli KLL geliştiği görülmüştür (126-127).

HL hücre serilerinde de yapılan çalışma doğrultusunda kontrol grubuna göre daha az ekprese edildiği, bunların da yüksek oranda metile olduğu görülmüştür. Normal şartlarda hücre döngüsünde aşırı ya da uygunsuz proliferasyon olan hücreyi G1 fazında durdurup S fazına girişini engellemekle ve apoptozisi (in vitro ve in vivo olarak) başlatarak yapmaktadır. Metilasyona uğramasına ikincil ekprese olamayan bu genin görevini ya eksik ya da hiç yapamayacağı gösterilmiştir. Çalışmada aşırı ifade edilen ile ifade edilmeyen rat grupları karşılaştırıldığında; aşırı ifade edilen grupta uzun dönem hayatta kalımın arttığı ve tümör regresyonunu indüklediği gösterilmiştir (128).

Çalışmamızda; *SPI1* geni hasta grupları içerisinde %73 oranında ekprese olmadığı, hasta gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç karşımıza çıkmıştır ($p=0.0001$). Bunun nedeni ise tamamen kontrol grubunun %95 oranın bu geni ekprese etmesinden kaynaklandığı görülmüştür.

Hasta ve kontrol grupları *SPI1* geni metilasyonu karşılaştırıldığında, hasta grubunda %73 olan metilasyon oranının, kontrol grubunda hiçbir bireyde metilasyon görülmemesiyle, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.0001$). Bu sonuç, TSG olarak görev yaptığı bilinen bu genin hasta grubunda hipermetilasyona uğrayarak baskılandığını ortaya koymaktadır.

PRDX2 (peroksiredoksin) geninin kuvvetli bir TSG adayı olduğu literatürde belirtilmektedir (15). Primer lösemi örneklerinde DNA hipermetilasyonu ve histon deasetilasyonu tekrarlayan kereler görülmektedir. Epigenetik değişiklikler ile *PRDX2* geninin düşük ekspresyonu korele olduğu ve AML hastalarında kötü prognoz ile seyrettiği belirtilmiştir. Schneider ve ark. bu genin miyeloid hücrelerde büyüme inhibitörü olduğunu söylemişler ve bu genin görevinin sadece miyeloid seride olmadığını klasik HL hastalarında olduğunu da göstermişlerdir. Normal B hücre popülasyonuna göre kıyaslandığında HL hastalarında yüksek oranda metile olduğunu ve bunla ilişkili olarak *PRDX2* mRNA kaybı olduğunu bulmuşlardır (129).

Çalışmamızda ise *PRDX2* geninin HL'de %80,5, NHL'de %53,3, kontrol grubunda ise yalnızca %5 oranında ekprese olmadığı ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p=0.0001$) saptandı. Farkın kontrol grubundan kaynaklandığı ve kontrol grubunda *PRDX2* gen ekspresyonunun hasta gruplarından anlamlı şekilde yüksek (%93) olduğu saptanmıştır.

Metilasyon çalışmasında, özellikle HL grubunda yüksek oranda metilasyon saptanırken, kontrol grubunda hiç metilasyon görülmemesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0001$). Bu sonuç, literatürde büyüme inhibitörü olarak nitelendirilen bu genin hasta grubumuzda DNA hipermetilasyonu ile susturularak baskılandığını göstermektedir.

Popüler bir gen olan *DLEC1* için ise literatürde tümör oluşumunda erken evrelerde olsa bile saptanabilen hedefe yönelik tedavide potansiyel bir tümör biyobelirteç olabileceğinden bahsedilmektedir. Öncesinde nazofarenks, baş-boyun, akciğer, mide, meme, serviks, renal karsinomlarda varlığı bilinen bu gen son beş yıl içerisinde lenfoma birlikteliği ile de anılmaktadır. Aynı zaman da genin bulunduğu kromozomal bölgede birçok TSG tanımlanmıştır. Hem hücre serileri hem de tümör dokularından oluşan bu çalışmada metilasyon oranlarının HL ve NHL'den oluşan 25 adet hücre serisinde BL ve HL %100 oranında olduğu, 58 tümör dokusunda ise FL'de %100, HL'de %53 ve BL'de %83 oranında olduğu görülmüştür. Diffüz büyük B hücreli lenfomalarda ise metilasyon oranı diğerlerine kıyasla belirgin olarak azdır (130).

Çalışmamızda ise HL grubunda %92,7, NHL grubunda %86,7, kontrol grubunda ise yalnızca %7,5 oranında DLEC1 ekspresyon kaybı saptanmıştır ($p=0.0001$). Hasta gruplarında, özellikle HL'de yüksek oranda metilasyon görülmesine karşın kontrol grubunda yalnızca 1 hastada metilasyon saptanması bu genin de DNA hipermetilasyonu ile susturularak baskılandığını göstermektedir.

Çalışmamıza dahil olan genler içerisinde belki daha az bilinen bir gen olan *FOXO1* geni için literatürde B hücrelerinde yüksek oranda ekprese olmasına rağmen klasik HL örneklerinde baskılandığı belirtilmiştir. Guan ve ark. (131) NHL alt tiplerinden diffüz büyük B hücreli lenfoma alt tipi olan primer mediastinal B hücreli lenfoma tanısı olan 20 hasta üzerinde çalışmışlardır. Sadece 1 hastada ekprese edildiği görülen bir transkripsiyon faktör geni olan *FOXO1*'in normal şartlarda yaptığı hücre içi sinyal mekanizmaları ile proliferasyon düzenini yapamayarak lenfomanın onkojenik oluşumuna katkıda bulunduğu belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamızda literatürden farklı olarak, *FOXO1* geninin hem hasta hem de kontrol gruplarında yüksek oranda ekprese olduğu görülmüştür. Metilasyon oranlarına bakıldığında ise; *FOXO1* geni HL grubunda %21,1 oranında metile olmuşken NHL ve kontrol grubunda hiçbir hasta da metilasyona uğramadığı görülmüştür. Metilasyon farkı istatistiksel olarak anlamlı olsa da ($p=0.029$), bu genin hem hasta hem de kontrol gruplarında ekprese olması, *FOXO1* malignite ve beniyin

lenfadenopatiler ile verilerimiz doğrultusunda ilişkisi olmadığını göstermektedir.

Çalışmamıza dâhil olan bir diğer gen olan *KLF4* geni için literatüre baktığımızda yine bir transkripsiyon faktörü olarak görev yaptığı görülmektedir (132). Bu geni diğerlerinden ayıran özelliklerinden biri ise hem onkogen hem de tümör süpresör gen olarak görev yapmasıdır. Onkogen olarak; larinks, cilt ve meme kanserlerinde rol alırken, TSG olarak ise hücre döngüsünde *CDKN1A* ve *CDKN1B* transkripsiyonel aktivasyonunu engelleyerek gastrointetinal kanal tümörlerinde karşımıza çıkmaktadır (133-134). *KLF4* aynı zamanda B hücre farklılaşması, proliferasyonu ve apoptozisin düzenlenmesinde görev almaktadır. *KLF4* indüksiyonu ile *FOXO1* transkripsiyon faktörü yardımı ile B hücre proliferasyonunu da engellediği düşünülmektedir (135). Ayrıca *SPI1* transkripsiyon faktörü, *KLF4*'ün transkripsiyonel aktivatörüdür (136). B hücre lenfomaları *KLF4* geninin epigenetik olarak sessizleşmesi ile hücre döngü kontrol mekanizmalarında kaçıp, apoptozisten korunması ile oluşmaktadır (137).

Çalışmamızda ise *KLF4* geninin hem HL hem de NHL gruplarında çok düşük düzeyde eksprese edilirken, bu oranın kontrol grubunda %70 olduğu bulunmuştur. Metilasyon durumuna bakıldığında hasta gruplarının hepsinde ve kontrol grubunun %30'unda metile olduğu bulunmuştur ($p=0.0001$).

Hasta gruplarında metilasyona uğrayanların istatistiksel olarak kontrol grubuna göre ekprese olmadığı gösterilmesi; hem onkogen hem de TSG olarak görev yapan bu genin, hasta grubumuzda hipermetilasyon ile susturulan bir TSG olarak görev yaptığı anlaşılmaktadır.

DAPK1 geninin bilinen en eski tümör süpresör genlerden biri olan p53 ile ortak çalıştığı yollar olsa da bağımsız olarak da hücre içinde çok çeşitli ölüm yollarını aktifleyerek apoptozisi kolaylaştırdığı bilinmektedir. Hematolojik malignitelerden özellikle diffüz büyük B hücreli lenfomalarda ön plana çıkmaktadır. Kristensen ve ark. (138) yaptığı 119 diffüz büyük B hücreli lenfomadan oluşan bir hasta grubunda bu genin 102 hastada metile olduğu göstermiştir. *DAPK1* metilasyonunun genel hayatta kalımı azalttığı saptamıştır. Multivaryant analizler doğrultusunda *DAPK1* metilasyonunun varlığı yüksek LDH düzeyleri ve uluslararası prognoz indeksi ile istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır. Hatta tüm veriler doğrultusunda diffüz büyük B hücreli lenfomalarda bağımsız bir prognostik faktör olabileceği söylemişlerdir. *CDKN2A* ve *DAPK1* hipermetilasyonu agresif seyreden diffüz büyük B hücreli lenfoma ile ilişkili bulunmuştur (139). Yine literatürde DNA metilasyon heterojenitesinin hastalığın agresifliği ile yakından ilişkili olduğu belirtilmiştir (140).

Çalışmamızda *DAPK1* gen ekspresyon oranları HL'de % 63,4, NHL'de %33,3, kontrol grubunda ise %90 olarak bulunmuştur ($p<0.001$). Metilasyon durumlarına bakıldığında HL'de %47,4, NHL'de %72,7, kontrol grubunda ise yalnızca %10 bulunmuştur ($p=0.001$). Bu sonuç, *DAPK1*

geninin özellikle NHL hastalarında hipermetile olarak baskılandığı göstermektedir. Hasta grubumuzda Cox regresyon analizinde genel ve olaysız yaşam ile ilişkili görülen ($p=0.029$) tek parametrenin DAPK1 metilasyonu olması da dikkat çekicidir. Bununla birlikte DAPK1 ekspresyonunun genel ve olaysız yaşam üzerine etkisinin olmaması nedeniyle bu bulgunun daha geniş serilerde doğrulanması gerekliliği düşünüldü. Bu bulgular Kristensen ve ark. yaptığı diffüz büyük B hücreli lenfoma çalışmasındaki veriler ile birleştirildiğinde, *DAPK1* geninin prognostik bir parametre adayı olabileceği söylenebilir.

Sonuç olarak,

- Çalışmamıza dahil ettiğimiz 7 genden *SPI1*, *PRDX2*, *DLEC1*, *KLF4*, *DAPK1*'in kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında düşük oranda ekprese olduğu, aynı zamanda metilasyon durumları da kontrol grubuna göre daha yüksek oranda metilasyona uğramış olduğunu saptadık. Bu genlerin kanser oluşum patogenezinde TSG olarak görev yaptığı göz önüne alındığında hipermetilasyona bağlı düşük ekspresyonun son derece anlamlı olduğu görülmüştür.
- *CDKN2A* geni ise hem hasta grupta hem de kontrol grubumuzda ekprese olmadığından maligniteye özgül olmadığı düşünülmüştür.
- *FOXO1* geni ise hem hastalarda hem de kontrol gruplarında ekprese olduğu görünmektedir.

- Hasta gruplarda ekprese olmayan genlerin birçok mekanizma ile etkisizleşebileceği bilinmekle birlikte; çalışmamızda bu genlerin yüksek oranda metilasyona uğrayarak işlevlerini yitirdiğini gösterdik.
- Çalışmamızdaki bu sonuçlar, *SPI1*, *PRDX2*, *DLEC1*, *KLF4*, *DAPK1* genlerinin çocukluk çağı HL ve NHL etyopatogenezinde rol aldığını göstermektedir. Daha çok sayıda hasta ile yapılacak olan geniş çalışmalarda elde edilecek veriler ile bu genlerin çocukluk çağı lenfomalarında biyobelirteç ya da tedavi hedefleri için aday olup olamayacağı gösterilebilir.

6.SONUÇLAR

- 41 HL hastasının 10 yıllık genel yaşam analizi %94 iken; olaysız yaşamı %91 bulundu.
- HL hastalarının evrelerine göre 10 yıllık genel yaşamı evre I-II-III için %100 iken; evre IV için %80 bulundu.
- HL hastalarının evrelerine göre 10 yıllık olaysız yaşamı evre I-II-III için %100 iken; evre IV için %70 bulundu.
- 15 NHL hastasının 5 yıllık genel yaşam ve olaysız yaşamı %82 bulundu.
- NHL hastalarının evrelerine göre 5 yıllık genel ve olaysız yaşamı evre III için %89, evre IV için %67 bulundu.
- *CDKN2A* geninin tüm hasta gruplarında metile olmasına rağmen hasta ve kontrol grubunun her ikisinde de ekprese olmaması, *CDKN2A* geninin hücre proliferasyonunda önemli bir görevi olduğu kanısına varıldı. Kontrol grubunun reaktif lenf nodu ve lenfoid hiperplazilerden oluşması nedeniyle bu genin epigenetik değişikliklerinin tümör oluşumuna özgü olmadığı düşünüldü.
- *FOXO1* geninin metilasyon oranı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulunmakla beraber, bu genin ekspresyonu hem hasta hem de kontrol gruplarında yüksek olarak saptandı.

- HL ve NHL gruplarında *SPI1*, *PRDX2*, *DLEC1*, *KLF4* ve *DAPK1* genlerinin ekspresyon oranları düşük, metilasyon oranları ise yüksek olarak bulundu. Bu genlerin epigenetik değişikliklerinin lenfoma patogeneğinde önemli rolü olduğu sonucuna varıldı.
- *DAPK1* geninin özellikle NHL hastalarında hipermetile olarak baskılandığı görüldü. Hasta grubumuzda Cox regresyon analizinde genel ve olaysız yaşam ile ilişkili görülen ($p=0.029$) tek parametrenin *DAPK1* metilasyonu olması da dikkat çekici bulundu.

7. ÖZET

Çocuk ve Adolesan Lenfomalarının Etyopatogenezinde Tümör Baskılayıcı Genlerde DNA Metilasyonunun Rolü

Amaç: Çocukluk çağı lenfomalarının etyopatogenezinde epigenetik değişikliğe uğrayarak rol oynadığı öne sürülen 7 ayrı gen için ekspresyon ve metilasyon durumlarını belirleyerek genel ve olaysız yaşam üzerine olan etkisini araştırmaktır.

Hastalar ve Yöntem: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Onkoloji bölümünde 2000-2015 yılları arasında izlenen 41 HL, 15 NHL ve 40 maliyn olmayan lenf nodu proliferasyonu olmak üzere, patolojik değerlendirmesi merkezimizde yapılan ve doku örnekleri yeterli olan toplam 96 çocuk çalışmaya alındı. Doku örneklerinden DNA ve RNA izolasyonu yapılarak RT- qPCR ve metilasyon spesifik PCR çalışması yapıldı.

Bulgular: Hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında hasta grubunda *SPI1*, *PRDX2*, *KLF4*, *DLEC1* *DAPK1* genlerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az ekprese olduğu, *CDKN2A* ve *FOXO1* genlerinin ekspresyonunun ise hasta ve kontrol gruplarında istatistiksel olarak farklı olmadığı görüldü. Metilasyon oranlarına bakıldığında; *CDKN2A* ve *FOXO1* geni hariç çalışılan tüm genlerde metilasyon oranları HL ve NHL gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu.

Sonuç: Çocukluk çağı HL ve NHL hastalarının tümör doku örneklerinde *SPI1*, *PRDX2*, *DLEC1*, *KLF4*, *DAPK1* genlerinin hipermetilasyon ile susturuldukları saptandı. *CDKN2A* geninin hem hasta hem de kontrol gruplarında ekprese olmaması nedeniyle maliyniteye özgül olmadığı sonucuna varıldı. *FOXO1* geni ise hem hastalarda hem de kontrol gruplarında ekprese olduğundan maliynite ile ilişkisi gösterilemedi.

8.SUMMARY

The Role of DNA Methylation of The Tumor Suppressor Genes in Etiopathogenesis of Childhood and Adolescent Lymphomas

Purpose: The aim of the study is to investigate the expression and methylation status of 7 distinctive genes with tumor suppressing properties in childhood lymphomas.

Patients and Methodology: A total of 96 patients (41 HL, 15 NHL and 40 non-malignant lymph node proliferation) who are followed up between 2000-2015 in the Pediatric Oncology Division of Pediatrics Department of Gazi University and whose pathological examination were performed in our center are included in the research. Specific PCR studies of RT-qPCR and methylation were performed by making DNA and RNA isolation in tissue samples.

Results: When patient groups and control groups are compared, we found that *SPI1*, *PRDX2*, *KLF4*, *DLEC1* *DAPK1* genes are significantly less expressed with respect to control group. However, expression of *CDKN2A* and *FOXO1* genes in the patient and control groups were not statistically different. The methylation ratios of all genes excluding the *CDKN2A* and *FOXO1* genes in HL and NHL groups were significantly higher than the controls.

Conclusion: We showed that *SPI1*, *PRDX2*, *DLEC1*, *KLF4*, *DAPK1* genes are silenced with hypermethylation in the tumor tissue samples of the childhood HL and NHL patients. Due to the fact that *CDKN2A* gene is not expressed in both of the patient and control groups, we concluded that it is not specific to malignancy. As *FOXO1* gene were expressed in both of the patient and control groups, its relation with malignancy could neither be found.

9.KAYNAKLAR

1. Kay NE, Ackerman SK, Douglas SD. Anatomy of the immune system.Semin Hematol. 1979; 16:252-282.
2. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. Nat Rev Cancer. 2005;5:251-262.
3. Kutluk T. First national pediatric cancer registry in Turkey: A Turkish pediatric Oncology Group Study. Ped Blood & Cancer (Abstract) 2004,43:452.
4. Kutluk T, Yeşilipek A. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu/Türk Pediatrik Hematoloji Derneği Pediatrik Tümör Kayıtları. www.turkishpediatriccancerregistry.org. 2007.
5. Linet MS, Ries LA, Smith MA, et al. Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. J Natl Cancer Inst. 1999;91:1051-1058.
6. Rappaport H. Tumors of Hematopoietic System. Atlas of Tumor Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, 1966
7. Lukes R. Collins R. Immunologic characterization of human malignant lymphomas, Cancer, 34:1488-1503, 1974.
8. Lennert K. Feller A. Histopathology of Non-Hodgkin Lymphomas, New York, Springer-Verlag 1992.

9. Rosenberg SA, et al. National Cancer Institute sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphomas. Summary and description of a working formulation for clinical usage, Cancer, 49:2112-2135, 1982.
10. Harris NL, et al. A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A proposal from the international Lymphoma Study Group, Blood, 64:1361-1392, 1994
11. Pathology & Genetics. Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues, World Health Organization, IARC press, Lyon 2001. // 11a. Steven H. Swerdlow. 11a: The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood. 2016;127:2375-2390
12. Hodgkin T. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. Medico-Chirurgical Transactions. 1832;17:68.
13. Wilks S. Cases of enlargement of the lymphatic glands and spleen (Hodgkin's disease) with remarks. Guy's Hosp Rep. 1865;11:56.
14. Sternberg C. Über eine eigenartige, unter dem bilde der pseudo-leukaemie verlaufende tuberkulose des lymphatischen apparates. Z Heilk. 1889;19:21-90
15. Reed DM. On the pathological changes in Hodgkin disease with special reference to its relation to tuberculosis. Bull Johns Hopkins Hosp. 1902;10:133-196.
16. Seif GS, Spriggs AI. Chromosome changes in Hodgkin's disease. J Natl Cancer Inst. 1967;39:557-570.

17. Kuppers R, Rajewsky K, Zhao M, et al. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:10962-10966.
18. Ludman H, Spear PW. Reed-ternberg cells in the peripheral blood: report case of Hodgkin' s Disease. *Blood*. 1957;12:189-192)
19. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds). World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France, IARC Press, 2001.
20. Klinik Gelişim, İstanbul Tabib Odası Süreli Bilimsel Yayını 2007, CİLT 20, Sayı:2
21. Stein H, Marafioti T, Foss HD, et al. Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood*. 2001;97:496-501.
22. Anagnostopoulos I, Hansmann ML, Franssila K, et al. European Task Force on Lymphoma project on lymphocyte-predominant Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes. *Blood*. 2000;96:1889-1899.
23. Cartwright RA, Watkins G. Epidemiology of Hodgkin's disease: a review. *Hematol Oncol*. 2004;22:11-26.

24. Özkan, A. *Pediatric Oncology*, 2009, 543-611.
25. Lanzkowsky, P. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*, 5th ed. 2011, pp 599-623.
26. Spitz MR, Sider JG, Johnson CC, et al. Ethnic patterns of Hodgkin disease incidence among children and adolescents in the United States, 1973-82. *J Natl Cancer Inst.* 1986;76:235-239.
27. Percy CL, Smith MA, Linet M, et al. Lymphomas and reticuloendothelial neoplasms. In Reis LAG, Smith MA, Gurney JG, et al (eds). *Cancer Incidence and Survival Among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995*
28. Dörffel W, Schellong G. Morbus Hodgkin. In Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J (eds). *Paediatrische Haematologie und Onkologie*. Heidelberg, Germany, Springer, 2006, pp 770-776.
29. Khan G, Coates PJ. The role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *J Pathol.* 1994;174:141-149.
30. Martin D. Abeloff, James O. Armitage, Allen S. Lichter, John E. Niederhuber, *Clinical Oncology*, second edition, 2000, pp 2620-2657.
31. Yahalom J, Straus D. Hodgkin's lymphoma. In: Pazdur R, Coia LR, Hoskins WJ, Wagman LD, editors. *Cancer management: a multidisciplinary approach*. 9th ed. Lawrence, KS: CMP Healthcare Media; 2005. p 675
32. Martin D. Abeloff, James O. Armitage, Allen S. Lichter, John E. Niederhuber, *Clinical Oncology*, second edition, 2000, pp 2620-2657.

33. Gross TG, Perkins SL. Malignant Non-Hodgkin Lymphomas in Children. In Pizzo PA, Poplack DG. Principles and Practice of Pediatric Oncology, 6th edition. Philadelphia, Wolters Kluwer / Lippincott Williams&Wilkins, 2011: pp. 663-682.
34. Perkins SL, Morris SW. Biology and Pathology of Pediatric Non-Hodgkin Lymphoma. In Weinstein HJ, Hudson MM, Link MP, eds. Pediatric Lymphomas, First edition. New York, Springer, 2007: pp. 91
35. Miles RR, Raphael M, McCarthy K, et al. Pediatric diffuse large B-cell lymphoma demonstrates a high proliferation index, frequent c-Myc protein expression, and a high incidence of germinal center subtype: Report of the French-American-British (FAB) international study group. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 51 (3): 369-374.
36. Paepe P, Wolf-Peeters C. Diffuse large B-cell lymphoma: a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas comprising several distinct clinicopathological entities. *Leukemia* 2007; 21: 37-43
37. Leval L, Haris NL. Variability in immunphenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its clinical relevance. *Histopathology* 2003; 43: 509-528.
38. Rossi D, Gaidano G. Molecular Heterogeneity of Diffuse Large B-cell Lymphoma: Implications for Disease Management and Prognosis. *Hematology* 2002; 7 (4): 239-252.
39. Reiter A, Riehm H. Large cell lymphomas in children. In Magrath IT, eds. The Non-Hodgkin's Lymphomas, Second edition. New York, Arnold, 1997: pp. 829-851.

40. Knowles DM, Chamulak GA, Subar M, et al. Lymphoid neoplasia associated with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The New York University Medical Center experience with 105 patients (1981-1986). *Ann Intern Med.* 1988;108:744-753.
41. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet.* 1964;15:702-703.
42. Cohen JL. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med.* 2000;343:481-492.
43. Perkins SL, Morris SW. Biology and Pathology of Pediatric Non-Hodgkin Lymphoma. In Weinstein HJ, Hudson MM, Link MP, eds. *Pediatric Lymphomas*, First edition. New York, Springer, 2007: pp. 91-127.
44. Tsang P, Caserman E, Chadburn A, et al. Molecular characterization of primary mediastinal B cell lymphoma. *Am J Pathol* 1996; 148: 2017- 2025.
45. Kutluk T, Varan A, Akyuz C, et al. Clinical Characteristics and Treatment Results of LMB/LMT Regimen in Children with Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Investigation* 2002; 20: 626-633.
46. Reiter A. Diagnosis and treatment of childhood non-hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007, 2007: pp. 285-296.
47. Woessmann W, Seidemann K, Mann G, et al. The impact of the methotrexate administration Schedule and in the treatment of children and adolescents with B-cell neoplasms: a report of the BFM Group Study NHL-BFM95. *Blood* 2005; 105: 948-958.

48. Patte C, Philip T, Rodary C, et al. Improved survival rate in children with stage III and IVB non Hodgkin lymphoma and leukemia using multy-agent chemotherapy: Result of study of 114 children from the French Pediatric Oncology Society. J Clin Oncol 1986; 4: 1219-1226.
49. Reiter A, Schrappe M, Tiemann M, et al. Improved treatment results in children B-cell neoplasms with tailored intencification of therapy: a report of the Berlin-Frankfurt-Munster Group Trial NHL-BFM 90. Blood 1999; 94: 3294-3306.
50. Doğu GG, Çıtlı R, Dikilitaş M, Özkan M, Er Ö, Öztürk A, Altınbaş M. Kemoterap alan hastaların sosyodemografik ve tanısal özellikleri. Erciyes Tıp Dergisi. 2007; 29 (2),132-138.
51. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Cancer genetics and genomics. Thompson & Thompson Genetics and Medicine, Saunders, Seventh Edition, Philadelphia, 2007.
52. Yamada T, Nakamori S, Ohzato H. Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma: Correlation with clinicopathological features. Clinical Cancer Research. 1998; 4,1527-1532.
53. Dinçer Y, Akçay T. DNA Hasarı. Türk Biyokimya Dergisi. 2000; 25,2:73-79.
54. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. Nature. 2009; 461 (7267):1071-8.
55. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer Journal of Clinical Oncology. 2011; 61 (2):69-90.

56. Podlaha O, Riester M, De S, Michor F. Evolution of the cancer genome. *Trends in Genetics*. 2012; 28 (4):155-63.
57. You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: Two sides of the same coin?. *Cancer Cell*. 2012; 22 (1):9-20.
58. Chervona Y, Costa M. Histone modifications and cancer: biomarkers of prognosis. *American Journal Of Cancer Researchs*. 2012; 2 (5):589- 97.
59. Pogribny IP, Rusyn I. Environmental toxicants, epigenetics and cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013; 754:215-32.
60. Holwerda S, de Laat W. Chromatin loops, gene positioning, and gene expression. *Frontiers in Genetics*. 2012; 3:217.
61. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. *Cell*. 2012; 150 (1):12-27.
62. Waddington CH. The epigenotype. 1942. *International Journal of Epidemiology*. 2012; 41 (1):10-3.
63. Hassler MR, Egger G. Epigenomics of cancer emerging new concepts. *Biochimie*. 2012.
64. Gerhauser C. Cancer chemoprevention and nutri-epigenetics: State of the art and future challenges. *Topics Current Chemistry*. 2012.
65. Martín-Subero JI. How epigenomics brings phenotype into being. *Pediatric Endocrinology*. 2011; 9 Supplement1:506-10.

66. Sandoval J, Esteller M. Cancer epigenomics: Beyond genomics. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2012; 22 (1):50-5.
67. Lansdorp PM, Falconer E, Tao J, Brind'amour J, Naumann U. Epigenetic differences between sister chromatids. *Annals of the New York Academy*. 2012; 1266 (1):1-6.
68. Carone DM, Lawrence JB. Heterochromatin instability in cancer: From the Barr body to satellites and the nuclear periphery. *Seminars in Cancer Biology*. 2012; 23 (2):99-108.
69. Hatziapostolou M, Iliopoulos D. Epigenetic aberrations during oncogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011; 68 (10):1681-702
70. Sawan, C., Vaissie`re, T., Murr, R. ve Herceg, Z. (2008). Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutation Research*, 642, 1–13.
71. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: A landscape takes shape. *Cell*. 2007; 128 (4):635-8.
72. Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*. 2009; 462 (7271):315-22.
73. Goel A. DNA methylation-based fecal biomarkers for the noninvasive screening of GI cancers. *Future Oncology*. 2010; 6 (3):333-6.

74. Sayın DB. Metilasyon ve kanser. Türkiye Klinikleri. 2008; 28:513-524.
75. Umer M, Herceg Z. Deciphering the epigenetic code: An overview of DNA methylation-analysis methods. Antioxid Redox Signal. May 20, 2013; 18 (15):1972-1986.
76. Egger, G., et al., Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature, 2004. 429 (6990): p. 457-63.
77. Smallwood SA, Kelsey G. De novo DNA methylation: A germ cell perspective. Trends in Genetics. 2012; 28 (1):33-42.
78. Das, P.M. ve Singal, R. (2004). DNA Methylation and Cancer. Journal of Clinical Oncology, 22, 4632-4642.
79. Feinberg, A.P. ve Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. Nature, 301, 89-92.
80. Singal, R. ve Ginder, G.D. (1999). DNA methylation. Blood, 93, 4059-4070.
81. Ohtani-Fujita, N., Fujita, T., Aoike, A., Osifchin, N.E., Robbins P.D. ve ark. Sakai, T., (1993). CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. Oncogene, 8 (4), 1063-1067.
82. Herman, J.G. ve Baylin, S.B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. The New England Journal of Medicine, 349 (21), 2042-2054.

83. Gonzalez-Zulueta, M., Bender, C.M., Yang, A.S., Nguyen, T., Beart, R.W., Van Tornout, J.M. ve ark. (1995). Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing, *Cancer Research*, 55 (20), 4531-4535.
84. Wang, Z., et al., Epigenetic silencing of the 3p22 tumor suppressor DLEC1 by promoter CpG methylation in non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas. *J Transl Med*, 2012. 10: p. 209.
85. Xie, L., et al., FOXO1 downregulation contributes to the oncogenic program of primary mediastinal B-cell lymphoma. *Oncotarget*, 2014. 5 (14): p. 5392-402
86. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications. *Nature Reviews Cancer*. 2011; 11 (10):726-34.
87. Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics*, 8 (4), 286-298.
88. Robertson, K.D. (2002). DNA methylation and chromatin: Unraveling the tangled web. *Oncogene*, 21, 5361-5379.
89. Das, P.M. ve Singal, R. (2004). DNA Methylation and Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22, 4632-4642.
90. Choumenkovitch, S.F., Selhub, J., Bagley, P.J., Maeda, N., Nadeau, M.R., Smith, D.E. ve ark. (2002). In the cystathionine beta-synthase knockout mouse, elevations in total plasma homocysteine increase tissue S-adenosylhomocysteine, but responses of S-adenosylmethionine and DNA methylation are tissue specific. *Journal of Nutrition*, 132 (8), 2157-2160.

91. Davis, C.D. ve Uthus, E.O. (2004). DNA methylation, Cancer Susceptibility and Nutrient Interactions. The Society for Experimental Biology and Medicine, 229 (10), 988-995.
92. Alessia Bari. (2016) Absolute monocyte count at diagnosis could improve the prognostic role of early FDG-PET in classical Hodgkin lymphoma patients.
93. Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (APC): A multifunctional tumor suppressor gene. Journal of Cell Science. 2007; 120:3327-3335.
94. Ji, H., et al., Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. Nature, 2010. 467 (7313): p. 338-42.
95. Chim, C.S., et al., Methylation of p15 and p16 genes in adult acute leukemia: lack of prognostic significance. Cancer, 2001. 91 (12): p. 2222-9.
96. Martinez-Delgado, B., et al., Hypermethylation of p15/ink4b/MTS2 gene is differentially implicated among non-Hodgkin's lymphomas. Leukemia, 1998. 12 (6): p. 937-41.
97. Pinyol, M., et al., p16 (INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. Blood, 1998. 91 (8): p. 2977-84.
98. Rossi, D., et al., Aberrant promoter methylation of multiple genes throughout the clinico-pathologic spectrum of B-cell neoplasia. Haematologica, 2004. 89 (2): p. 154-64.

99. Nakatsuka, S., et al., Hypermethylation of death-associated protein (DAP) kinase CpG island is frequent not only in B-cell but also in T- and natural killer (NK)/T-cell malignancies. *Cancer Sci*, 2003. 94 (1): p. 87-91.
100. Raval, A., et al., Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, 2007. 129 (5): p. 879-90.
101. Chim, C.S., et al., Frequent DAP kinase but not p14 or Apaf-1 hypermethylation in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J Hum Genet*, 2006. 51 (9): p. 832-8.
102. Yuki, H., et al., PU.1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells. *Blood*, 2013. 121 (6): p. 962-70.
103. Guan, H., et al., KLF4 is a tumor suppressor in B-cell non-Hodgkin lymphoma and in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2010. 116 (9): p. 1469-78.
104. Kristensen, L.S., et al., Hypermethylation of DAPK1 is an independent prognostic factor predicting survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*, 2014. 5 (20): p. 9798-810.
105. Robaina, M.C., et al., Quantitative analysis of CDKN2A methylation, mRNA, and p16 (INK4a) protein expression in children and adolescents with Burkitt lymphoma: biological and clinical implications. *Leuk Res*, 2015. 39 (2): p. 248-56.
106. Schneider, M., et al., The PRDX2 gene is transcriptionally silenced and de novo methylated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2014. 123 (23): p. 3672-4.

107. Taylor, K.H., et al., Aberrant epigenetic gene regulation in lymphoid malignancies. *Semin Hematol*, 2013. 50 (1): p. 38-47.
108. Cimmino, L., et al., TET1 is a tumor suppressor of hematopoietic malignancy. *Nat Immunol*, 2015. 16 (6): p. 653-62.
109. Matsuda, I., Y. Imai, and S. Hirota, Distinct global DNA methylation status in B-cell lymphomas: immunohistochemical study of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *J Clin Exp Hematop*, 2014. 54 (1): p. 67-73.
110. Jundt, F., Kley, K., Anagnostopoulos, I., Schulze Probsting, K., Greiner, A., Mathas, S., Scheidereit, C., Wirth, T., Stein, H. and Dörken, B. (2002) Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease. *Blood* 99; 3060–3062.
111. Overbeck, B.M., et al., ETS1 encoding a transcription factor involved in B-cell differentiation is recurrently deleted and down-regulated in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, 2012. 97 (10): p. 1612-4.
112. Dhiab, M.B., et al., DNA methylation patterns in EBV-positive and EBV-negative Hodgkin lymphomas. *Cell Oncol (Dordr)*, 2015. 38 (6): p. 453-62.
113. Lue, J.K., J.E. Amengual, and O.A. O'Connor, Epigenetics and Lymphoma: Can We Use Epigenetics to Prime or Reset Chemoresistant Lymphoma Programs? *Curr Oncol Rep*, 2015. 17 (9): p. 40.

114. Bethge, N., et al., Identification of highly methylated genes across various types of B-cell non-hodgkin lymphoma. *PLoS One*, 2013. 8 (11): p. e79602.
115. Hecht JL, Aster JC. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol* 2000;18:3707–21.
116. Lindstrom MS, Wiman KG. Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol* 2002;12:381–7.
117. Klangby U, Okan I, Magnusson KP, Wendland M, Lind P, Wiman KG. p16/INK4a and p15/INK4b gene methylation and absence of p16/INK4a mRNA and protein expression in Burkitt's lymphoma. *Blood* 1998;91:1680–7.
118. Baur AS, Shaw P, Burri N, Delacretaz F, Bosman FT, Chaubert P. Frequent methylation silencing of p15 (INK4b) (MTS2) and p16 (INK4a) (MTS1) in B-cell and T-cell lymphomas. *Blood* 1999;94:1773–81.
119. Sanchez-Beato M, Saez AI, Navas IC, Algara P, Sol Mateo M, Villuendas R, et al. Overall survival in aggressive B-cell lymphomas is dependent on the accumulation of alterations in p53, p16, and p27. *Am J Pathol* 2001;159:205–13.
120. Skalska L, White RE, Franz M, Ruhmann M, Allday MJ. Epigenetic repression of p16 (INK4A) by latent Epstein–Barr virus requires the interaction of EBNA3A and EBNA3C with CtBP. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000951.
121. White RE, Groves IJ, Turro E, Yee J, Kremmer E, Allday MJ. Extensive cooperation between the Epstein–Barr virus EBNA3 proteins in the manipulation of host gene expression and epigenetic chromatin modification. *PLoS ONE* 2010;5:e13979.

122. Lue, J.K., J.E. Amengual, and O.A. O'Connor, Epigenetics and Lymphoma: Can We Use Epigenetics to Prime or Reset Chemoresistant Lymphoma Programs? *Curr Oncol Rep*, 2015. 17 (9): p. 40.
123. Robaina, M.C., et al., Quantitative analysis of CDKN2A methylation, mRNA, and p16 (INK4a) protein expression in children and adolescents with Burkitt lymphoma: biological and clinical implications. *Leuk Res*, 2015. 39 (2): p. 248-56.
124. Scott EW, Simon MC, Anastasi J, Singh H. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*. 1994;265 (5178):1573-1577.
125. McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, et al. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J*. 1996;15 (20):5647-5658.
126. Rosenbauer F, Wagner K, Kutok JL, et al. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet*. 2004;36 (6):624-630.
127. Rosenbauer F, Owens BM, Yu L, et al. Lymphoid cell growth and transformation are suppressed by a key regulatory element of the gene
128. Yuki, H., et al., PU.1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells. *Blood*, 2013. 121 (6): p. 962-70.
129. Schneider, M., et al., The PRDX2 gene is transcriptionally silenced and de novo methylated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2014. 123 (23): p. 3672-4.

130. Wang, Z., et al., Epigenetic silencing of the 3p22 tumor suppressor DLEC1 by promoter CpG methylation in non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas. *J Transl Med*, 2012. 10: p. 209.
131. Xie, L., et al., FOXO1 downregulation contributes to the oncogenic program of primary mediastinal B-cell lymphoma. *Oncotarget*, 2014. 5 (14): p. 5392-402.
132. Wei D, GongW, Kanai M, et al. Drastic down-regulation of Kruppel-like factor 4 expression is critical in human gastric cancer development and progression. *Cancer Res*. 2005;65 (7):2746-2754.
133. Rowland BD, Peeper DS. KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6 (1):11-23.
134. Wei D, Kanai M, Huang S, Xie K. Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer. *Carci-nogenesis*. 2006;27 (1):23-31.
135. Yusuf I, Kharas MG, Chen J, et al. KLF4 is a FOXO1 target gene that suppresses B cell proliferation. *Int Immunol*. 2008;20 (5):671-681.
136. FeinbergMW,Wara AK, Cao Z, et al. The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *EMBO J*. 2007;26 (18): 4138-4148.
137. Guan, H., et al., KLF4 is a tumor suppressor in B-cell non-Hodgkin lymphoma and in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2010. 116 (9): p. 1469-78.
138. Kristensen, L.S., et al., Hypermethylation of DAPK1 is an independent prognostic factor predicting survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*, 2014. 5 (20): p. 9798-810.

139. Lee SM, Lee EJ, Ko YH, Lee SH, Maeng L, Kim KM. Prognostic significance of O6-methylguanine DNA methyltransferase and p57 methylation in patients with diffuse large B-cell lymphomas. *APMIS*. 2009;117:87–94.
140. De, S., et al., Aberration in DNA methylation in B-cell lymphomas has a complex origin and increases with disease severity. *PLoS Genet*, 2013. 9 (1): p. e1003137.
141. (Patra SK, Patra A, Ghosh TC, et al. (2008). "Demethylation of (cytosine-5-C-methyl) DNA and regulation of transcription in the epigenetic pathways of cancer development". *Cancer Metast. Rev.* 27 (2): 315–334. [DOI:10.1007/s10555-008-9118-](https://doi.org/10.1007/s10555-008-9118-))