

EPSTEİN - BARR VİRÜS DNA'SININ İN - SİTU HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI: NAZOFARENGEAL KARSİNOMA, BURKİTT VE NON - BURKİTT LENFOMALAR

SERDETECTION OF EPSTEIN - BARR VIRUS (EBV) DNA WITH INSITU HYBRIDIZATION (ISH) METHOD: IN NASOPHARENGEAL CARCINOMA (NPC), BURKITT AND NON - BURKITT LYMPHOMAS

Dr. Gülen AKYOL, Dr. Cem SEZER, Dr. Aylar POYRAZ, Dr. Ömür ATAÖĞLU,
Dr. Betül ÇELİK, Dr. Ömer ULUOĞLU, Dr. Naci EDALI (*)

ÖZET: Akut Epstein - Barr virüsü (EBV) orofarenksin epitel hücrelerini ve B lenfositleri enfekte edebilen bir DNA virüsüdür. İnsitu hibridizasyon (ISH) hücreSEL ya da viral DNA veya RNA'nın nükleik asit sekansının saptanabilmesini sağlar. EBV'nin nazofarenks karsinomları (NFK), bazı B ve T hücreli lenfomalarda etiyopatogeneizde rol aldığı bilinmektedir. Bu çalışmada 1990-1994 yılları arasında bölümümüze gelen 4 NFK, II Burkitt lenfoma, 2 lenfoblastik lenfoma, 6 diffüz büyük hücreli lenfoma ve I immünoblastik lenfomada ISH yöntemiyle EBV varlığını araştırdık.

Vakalarımızın 13'de (%54.1) EBV-DNA'yı saptadık. Pozitif boyanma nükleer lokalizasyon gösteriyordu. NFK'larının I'inde (%25) yaygın, hemen tüm nükleuslarda boyanma mevcuttu.

Burkitt lenfoma vakalarımızın 6'sında (%54.5), Burkitt dışı lenfomalarımızın yine 6'sında (%66.6) pozitiflik saptadık. EBV gösterilebilen diffüz büyük hücreli lenfomaların 3'ü CD20 (+), I'i CD 45RO (+), I'i de hem CD20(-) hem CD 45RO (-) idi. EBV-DNA (+) lenfoblastik lenfoma vakamız ise CD 45RO (+) olarak belirlendi. NFK materyallerimizde aldığımız sonuçlar düşük olmakla birlikte kesin bir yorum yapmak için vaka sayımız yetersizdir. Bunda doku kalitemiz, kullandığımız probun türü ve hedef viral genomun saptanabilir düzeyin altında olması etken olabilir. Burkitt lenfomalardaki oranımız endemik olanlardan düşük, sporadik vakalardan yüksektir. Bulgumuz Türkiye'deki Burkitt'lerin klinik olarak "intermediate" bir grup oluşturdukları ve normal populasyonda EBV insidansının yüksek olduğu düşünülürse çok şaşırtıcı değildir. Non-Burkitt lenfoma hasta grubumuzun çoğu B hücre özelliği göstermekteydi ki EBV'nin B hücre tropizmi bilinmektedir. T hücreli lenfomalarda EBV varlığı ise son yıllarda hem nazo/nazofarengeal hem de abdominal lokalizasyontarda yayınlanmıştır.

Anahtar Sözcükler:EBV, insitu hibridizasyon, nazofarenks karsinomu, Burkitt lenfoma, non-Burkitt lenfoma

SUMMARY: Acute EBV is a DNA virus that infects oropharyngeal epithelial cells and B lymphocytes. Insitu hybridization (ISH) provides detection of cellular and viral DNA or RNA nucleic acid sequences. EBV is known to be involved in the ethio-pathogenesis of NPCs and some B and T cell lymphomas. In the current study we tried to investigate the presence of EBV DNA using ISH method, in 4 NPCs, II Burkitt lymphomas (BL), 6 diffuse large cell lymphomas (DLCL), 2 lymphoblastic lymphomas (LL) and I immunoblastic lymphoma (IL) that were sent to our department between the years of 1990-1994. We detected EBV DNA in 13(54.1%) of the cases. Positive staining showed nuclear localization. in I (25%) of the NPCs diffuse, nuclear staining was seen in all of the cells. We detected positivity in 6 (54.5%) of BLs and in 6 of (66.6%) of non BLs. Among the EBV (+) DLCLs 3 were CD20 (+), I was CD 45RO (+) and I was CD 20(-). CD 45RO (-). LL which was EBV (+) was also found to be CD 45RO (+), Though the positivity in NPC materials was low, the number of cases was not enough to make a definitive conclusion. The quality of our tissues, the type of probe we used and the number of target viral genome which could be lower than detectable copies might be effective on our results. The positivity rates in our BLs were lower than endemic cases but higher than sporadic ones. Since BL cases in Turkey make an "intermediate" group clinically and EBV prevalence is high in normal population, this finding is not surprising. Most of the positive cases in our non BLs showed B cell feature which was consistent with B cell tropism of EBV. Recently presence EBV in some T cell lymphomas has been reported in both naso/nasopharyngeal and abdominal locations

Key Words: EBV, insitu hybridization, nasopharyngeal carcinoma, Burkitt lymphoma, non-Burkitt lymphoma

GİRİŞ

EBV herpes ailesinden bir DNA virüsüdür. Virüs orofarenksin epitel hücrelerini ve B lenfositleri enfekte eder. EBV tarafından zedelenen B hücreleri poliklonal aktivasyon ve proliferasyon gösterir. Burkitt lenfomanın Afrika tipinde, HIV enfeksiyonu ve

organ transplantasyonu sonrası immün sistemi baskılanmış bireylerin B hücreli lenfomalarında, Hodgkin hastalığı vakalarının bazılarında ve nazofarengeal karsinomların etyolojisinde rol oynadığı bilinmektedir.3 Son yıllarda nazal/nazofarengeal ve abdominal bölgede CD56 (+) T hücreli lenfomalarda %100 oranında saptanmıştır (2).

Afrika tipi Burkitt'in %90 dan fazlasında EBV genomu izlenmesine karşın, Afrika dışı Burkitt lenfo-

(*) Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD, Beşevler ANKARA

malarının sadece % 15 - 20 sinde bulunabilir. Nazofarengeal karsinomda ise hücrelerin hepsinde gösterilebilir ve %100 ilişki vardır. 3 EBV genomunun %40 - 50 oranında Reed Stenberg (RS) hücrelerinde yerleşebileceği bildirilmiştir. 3

İnsitu hibridizasyon (İSH) viral RNA veya DNA, hücresel RNA veya kromozomal DNA'nın nukleik asit sekansının lokalizasyonunu sağlar. Metodun ilk kullanımında "radyoaktif prob"lar kullanılmış olmasına karşın son zamanlarda "nonradyoaktif (floresan, biyotin, digoksinin)" işaretleme yöntemleri kullanılmaktadır. 5 İnsitu hibridizasyonu diğer hibridizasyon tekniklerinden ayıran özellik doku bütünlüğü bozulmadan çalışılabilmesidir. İnsitu hibridizasyon ile hücre içinde sadece 10 kopya olduğunda bile saptanabilmektedir. 5 İSH, protein gibi büyük molekülleri saptayabilen immunhistokimyaya (İHK) göre çok daha duyarlı bir metoddur (5).

Ülkemizde de baş boyun tümörleri, özellikle nazofarengeal karsinomunun EBV ile olan ilişkisi gerek immunhistokimyasal gerek insitu hibridizasyon yöntemleriyle araştırılmıştır (15,16,17).

Bizde bölümümüze gelen 2 lenfoblastik lenfoma, 11 Burkitt lenfoma, 6 büyük hücreli lenfoma, 1

immunoblastik lenfoma ve 4 nazofarenks karsinomunda (NFK) EBV varlığını insitu hibridizasyon yöntemiyle araştırdık.

YÖNTEM VE GEREÇ

Çalışmamız bölümümüze 1990-1994 yılları arasında gelen baş boyun bölgesine ait 10 vaka (3 Burkitt lenfoma, 1 büyük hücreli lenfoma, 2 lenfoblastik lenfoma ve 4 nazofarenks karsinomu) ile baş/boyun dışında lokalizasyon gösteren 11 vaka (8 Burkitt lenfoma, 2 büyük hücreli lenfoma, 1 immunoblastik lenfoma) ve lokalizasyonu bilinmeyen 3 vaka olmak üzere toplam 24 vakadan oluşmaktaydı. Dört nazofarenks tümörümüzün hepsi andiferansiye (ADK) karsinomdu. (Dünya sağlık örgütü, DSÖ kriterlerine göre) Vakaların yaş, cinsiyet dağılımları, lokalizasyonları ve histopatolojik tanıları tablo l'de gösterilmektedir.

Materyallerin hepsi %10'luk formalinde tespit edildikten sonra parafine gömülmüş dokulardı. Tanıyı en iyi temsil eden bloklardan Poly-L-ysine ile muamele edilmiş camlara 5 y luk kesitler alındı.

Tablo 1: Vakaların Cinsiyet, yaş, lokalizasyon, hitopatolojik tipleri ve EBV varlığına göre dağılımları

VAKA	CİNSİYET	YAŞ	LOKALİZASYONU	HİSTOPATOLOJİK TANI	EBV
1	E	52	Nazofarenks	Andiferansiye karsinom	-
2	K	-	"	"	-
3	E	-	"	"	+
4	E	-	"	"	-
5	E	-	Boyun	Burkitt lenfoma	+
6	E	15	Gingiva	"	+
7	E	18	Boyun	"	-
8	E	6	İleum	"	+
9	K	26	Adneks	"	-
10	E	5	Intra abdominal	"	+
11	E	64	Testis	"	-
12	E	*	Intra abdominal	"	+
13	E	5	"	"	+
14	E	9	Çekum	"	-
15	K	5	ince barsak	"	-
16	E	31	Supra klaviküler lenf nodu	Diffüz büyük hücreli lenfoma CD20 (+)	+
17	E	15	Lenf Nodu**	Diffüz büyük hücreli lenfoma CD20 (+)	+
18	K	65	Lenf Nodu**	Diffüz büyük hücreli lenfoma CD20 (+)	+
19	E	69	Kolon	Diffüz büyük hücreli lenfoma CD20 (-), CD45RO(-)	+
20	E	61	Lenf Nodu**	Diffüz büyük hücreli lenfoma CD20 (+)	-
21	E	18	Mezenterik lenf nodu	Diffüz büyük hücreli lenfoma CD45RO(+)	+
22	E	38	Gastro intestinal sitem	İmmunoblastik lenfoma CD45RO(+)	-
23	E	61	Supra klaviküler lenf nodu	Diffüz büyük hücreli lenfoma CD20 (+)	-
24	E	38	Servikal lenf nodu	Diffüz büyük hücreli lenfoma CD20 (+)	+

* Yaş belirtilmemiş (Pediatri bölümünden gelmiş)

** Lenf nodu lokalizasyonu bildirilmemiş

Lenfoma vakalarına daha önce "Working Formulation"a tanı verilmişti. Baskın hücre tipinin belirlenmesi içinde parafine gömülü olan dokularda çalışabilecek T hücreleri için CD 45RO, B hücreleri için CD20 ile boyama yapıldı.

IHKsal inceleme için rutin deparafinizasyonu takiben endojen peroksit ve protein blokajı sonrası CD45RO ve CD20 ile 2 saat süreyle oda sıcaklığında bekletildi. Streptavidin-Biyotin metodu uygulandı. Daha sonra reaksiyon H₂O₂ ile işaretli DAB (Diaminobenzidin tetrahidroklorid) aracılığı ile görüntülandı. Yıkamalarda PBS (pH 7.6) kullanıldı. Pozitif kontrol olarak kesin T ve B hücre lenfoma olduğu bilinen örnekler boyandı. Negatif kontrol için primer antikor dışındaki aşamalar aynen tekrarlandı.

ISH için kesitler standart metotla deparafinize edildikten sonra rehidratasyon için ksilol ve dereceli (%95, 70, 50) alkollerden geçirildi. Kesitlerin her biri yeni hazırlanmış proteinaz K solüsyonu ile 37° lik etüvde 15 dakika bekletilip 2 kez distile suda yıkandı. Dehidratasyon işlemi dereceli alkollerden (% 50, 70, 100) geçirilerek yapıldı.

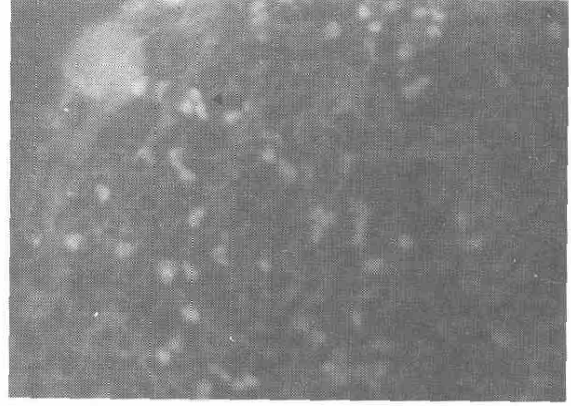
Hibridizasyon için EBV probu (Not I/Pst I DNA, Biogenex) hibridizasyon solüsyonu (formamide, SSC, sulfate) ile dilue edilerek (1/5) hazırlandı. Kesitler önce ayrışma (denalürasyon) aşaması için 95°C de 8-10 dakika bekletildi ve sonra 37°C lik etüvde 1 saat tutuldu. Hibridizasyon sırasında kapatma için plastik kaplayıcı (Cover slip, Oncor) kullanıldı ve hava kabarcığı kalmamasına özen gösterildi. Kesitler mevcut plastik kaplayıcılar düşene kadar 0.1 M Tris Buffer (PH 9.5) solüsyonunda (TBS) tutuldu. Bu işlemi takiben zemin boyanmasını önlemek için "Hibridizasyon yıkaması" (formamide, SSC) yapıldı. 10 dakika süreyle protein bloklaması için nonimmünize normal serum uygulandı. Sonra TBS ile yıkandı ve önce 20 dakika süreyle "Link 1" antifloresan antikor koyuldu. Yıkama işleminden sonra 20 dakika süreyle "Link 2" biyotinle işaretli antimouse immunglobulinde bekletildi. Daha sonra peroksidazla konjuge streptavidin uygulandı. Yıkama sonrası daha önce hazırlanan H₂O₂ li DAB (Diaminobenzidin tetrahidroklorid) ile 15 dakika boyandı ve hematoksilen ile zemin boyaması yapıldı.

Boyama sırasında kesitlerin tamamen kurumasına dikkat edildi. Her boyamada dokulardaki hücre DNA'sının korunup korunmadığını belirlemek için ALU kontrol probu olarak kullanıldı ve dokuların yeterli kalitede olduğu belirlendi.

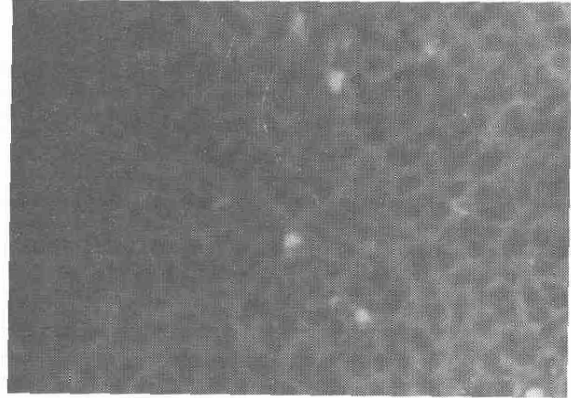
BULGULAR

Boyanan 24 materyalden 13'ünde (%54.1) pozitif nükleer boyanma saptandı. Bazı materyallerde bo-

yanma hemen tüm tümör hücrelerinin nükleuslarında iken bazılarında fokal boyanma izlendi. (Resim 1, 2)



Resim 1: (FITCX 400) Nazofarenks Karsinomunda Yaygın EBV - DNA (+) Nükleuslar İzleniyor. (Not I / Pst EBV DNA, İSH)



Resim 2: (FITCX 400) Diffüz büyük Hücreli Lenfoma Vakasında Fokal EBV - DNA (+) Nükleuslar İzleniyor. (Not I / Pst EBV DNA, İSH)

Hiçbir kesitte, varsa nontumoral lenfositler ya da NFde yüzey epitelinde boyanma görülmedi. Pozitif boyanan vakaların tanılarına göre dağılımı Tablo I'de özetlenmiştir.

Nazofarenks karsinomu vakalarının 4 ünden 1 inde (%25) yaygın hemen tüm nükleuslarda boyanma izlendi.

Burkitt lenfoma tanısı alan vakalarının toplam 6 sında (% 54.5) EBV DNA saptandı. Bunların 2 si (%18.1) baş boyun lokalizasyonu, 4 ü (%36.3) abdominal bölgede lokalize idi. Bir kısmında diffüz bir kısmında fokal nükleer boyanma gözlemlendi.

Burkitt dışı lenfomalarda tiplene amacıyla yapılan boyanma sonuçlarına göre 5'i CD20 pozitif, 3'ü CD45RO pozitif. Kolon lokalizasyonlu diffüz büyük hücreli lenfoma vakasında CD45RO ya da CD20 ile boyanma görülmediği için belirli bir immunfenotiplene yapılamadı.

Burkitt dışı lenfomaları 6 sında (%66.6) EBV DNA saptandı. 6 vakanın 5 inde belirgin diffüz nükleer boyanma izlenirken 1 inde daha az sayıda nükleer pozitiflik saptandı.

diffüz (+) olan vakaların 5 i diffüz büyük hücreli lenfoma idi. 1 İenfoblastik lenfoma vakasında fokal boyanma vardı. EBV saptanan diffüz büyük hücreli vakalarımızın 3 ü CD20 (+), 1 I CD45RO (+) idi. 1 i hem CD20 hem de CD45RO (-) olduğu için immunfenotiplene yapılamayan vakaydı. Diğer 1 vaka lenfoblastik lenfoma tanısı almış CD45RO (+) ti.

TARTIŞMA

EBV başta Afrika tipi Burkitt lenfoma olmak üzere, özellikle immun sistemi baskılanmış kişilerde gelişen B hücreli lenfomalar, bazı Hodgkin hastalığı vakaları ve NFK lan etyopatogenezinde bildirilmiştir (3, 11). EBV'nün B lenfomaların çok aşamalı gelişiminde bir faktör olduğu iyi bilinmektedir. Aslında EBV ün kendisinin direkt olarak onkogenik olduğu düşünülmektedir. Ancak poliklonal mitojenik bir etki göstererek hücrelerin mutasyona açık olmasını sağladığı ileri sürülmektedir (3).

EBV ile NFK nün bazı çalışmalarda % 100 ko-relasyon göstermesi bu virüsün tümörün oluşumunda kesin rol oynadığını düşündürmektedir. Bu yüksek orandaki birliktelik belirli coğrafi bölgelerde, özellikle uzakdoğu ve daha az oranda kuzey Afrika'da görülmesi aynı zamanda genetik ve bazı çevresel faktörlerin etkili olduğunu göstermiştir. Hücreler tarafından EBV ekspresyonunun tümörün "inisiasyonu" için gerekli olduğu ve preneoplastik olayların ve tümöral hücre fenotipinin oluşturulmasında diğer faktörlerin rolü olduğu ileri sürülmüştür (18). NFK larının hücrel differansiasyonunun azaldıkça EBV ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (6, 12). Bir çalışmada andiferansiyasyon bir NFK'daki en düşük nükleer boyanmanın fokal skuamoz diferansiyasyon alanlarında olduğu bildirilmiştir (12). Bizim NF kanseri vakalarımızın tümü ADK idi. Vakalarımızın ancak 1'inde (%25) diffüz nükleer boyanma ile karakterli EBV varlığı saptadık. Ülkemizde EBV - NFK ilişkisini araştıran bazı çalışmalarda (15, 16, 17). %49 - 79 arasında değişen oranlar bildirilmiştir. Bunlardan İHK ve İSH kombine eden çalışmada(15) İSH ile %49 oranında EBV saptanabilmişler ki buda literatüre oranla düşüktür. Bizim sonuçlarımız bunlarında çok altında ol-

makla birlikte sağlıklı bir yorum yapmak için vaka sayımız yetersizdir.

Sonuçlarımızın düşük olması materyallerimizin İSH gibi bir tekniği çalışmak için optimal tespit ve doku takip şartlarına sahip olmamasında kaynaklanıyor olabilir. Daha önce yapılan çalışmalarda da doku kalitesinin sonuçlara etkili olabileceği bildirilmiştir (1,22).

Aslında İSH un EBV varlığını göstermede en uygun yöntem olduğu bildirmektedir (1). İHK nın duyarlılığı (sensitivite) İSH a göre EBV için %50 daha düşüktür. Buna karşılık Polimeraz zincir reaksiyonu ise rezervuar nonpatojenik hücrelerdeki DNA'yı da amplifiye edebildiğinden, sonuçlar güvenilir değildir (1,8, 14). İSH da doku kalitesi kadar hücrelerin içerdiği hedef viral genom sayısının saptanabilir düzeyde olması da önemlidir. Düşük miktardaki virüsü saptamak zordur. Bu durum bizim vakalarımız içinde geçerli olabilir.

EBER latent EBV tarafından kodlanan RNA dır ve aktif viral replikasyon olmaksızın virüsün saptanabilmesini sağlar. Yayınların birçoğunda, Dr.Sarioğlu (15) ve ekibinin çalışması da dahil olmak üzere EBER kullanılmıştır. Birden fazla RNA ve DNA yapısındaki prob kullanılarak yapılan bir çakmada EBER in en iyi sonuçları verdiği bildirilmiştir. Hatta DNA nın saptanamadığı bazı materyallerde, EBER ile RNA varlığı gösterilebilmiştir (1, 21). Biz DNA (Not I/PsI I) yapısında prob kullandık. Ayrıca kullanılan probumuz aktif EBV enfeksiyonunu saptamaya yönelikti. Farklı problemlerin kullanıldığı aynı çalışmada, EBER'in iyi sonuç vermesinde virüsün latent dönemine yönelik olmasında etkili olduğu ve aktif enfeksiyona yönelik problemlerin daha düşük sonuçlara yol açtığı vurgulanmıştır (1).

EBV tüm Burkittlerde aynı oranda bildirilmemektedir. Endemik burkittte %90 in üzerinde, nonendemikte %15 oranında bildirilmektedir (2). Bizim vakalarımızda %54.5 oranındadır. Bu oran her iki grupta da tam olarak uyumlu değildir. Gingiva lokalizasyonlu, endemik tip klinik prezentasyonla uyumlu bir vakamı EBV DNA (+) bulunmuştur. Ancak geri kalan pozitif vakalarımızın çoğu abdominal yerleşimli olup daha çok sporadik grupla uyumludur, Türkiye'de Burkitt lenfomaların büyük bir kısmı abdominal lokalizasyonda bildirilmekte olup, ne Afrika nede Amerikan tipi olmayıp"ara form"dır (4, 7, 20). Yapılan çalışmalarda EBV prevalansı görülmektedir (4, 7). Bu durum bizim abdominal lokafizasyonu Burkitt vakalarımızda literatürden daha yüksek oranda bulunmasında etkili olabilir.

Burkitt dışı lenfomalı hasta grubumuzda EBV nü %66.6 oranında saptadık. Pozitif vakalarımızın 3 ü CD20 idi. Eskiden beri EBV'nün B lenfositlerine yer-

leşine eğilimi (tropizm) gösterdiği düşünülmektedir. EBV ile enfekte olan B hücreleri "immortalizasyon" kazanırlar. Bunda virüse ait LMP (Latent Membran Protein)nin rolü olduğu sanılmaktadır. Bir onkojen olan bcl-2 ile etkileşmesi sonucu apoptozisin engellediği düşünülmektedir (3).

Aslında EBV un lenfositlerden başka hücrelerde halta gerçek bir neoplazi olmayan "oral hairy cell lökoplaki" gibi lezyonlarda ve gastrik kanserlerde bile saptanabildiğine dair yayınlar vardır (10, 13). Ayrıca EBV un saptanması mutlaka lezyonun etyolojisinde rol aldığı anlamına gelmez. Çünkü EBV genel popülasyonda enfeksiyon oluşturabilir ve her zaman neoplaziye yol açmaz. Hatla zaten var olan bir tümöre "superpoze" olabilir (2, 10). Bu olasılıkları kesin uzaklaştırmak için daha geniş seriler ve birbirinden farklı problemler ile çalışmak gereklidir.

Non Burkitt lenfomalarından EBV saptanabildiği vakalarımızdan iki tanesi CD45RO (+) bulundu. Biri lenfoblastik lenfoma biri difüz large cell lenfomaydı. EBV un T hücreli lenfomalarda saptanabileceği ilk olarak 1988 yılında bildirilmiştir (9). Bir çalışmada nasal / nasofarengeal T hücreli lenfomalarda EBER %100 bulunmuştur (2). Daha sonra benzer gözlem abdominal lokalizasyonlu aynı özellikleri gösteren T hücreli lenfomalarda da bildirilmiştir (19). Bu vakaların ortak özelliği CD56 (+) CD3 (-) olmalarıdır. Bu antikörlerin her ikisinde ancak dondurulmuş taze dokularda çalışmaktadır. Bizim çalışmamız arşiv çalışması olduğu için bu antikörleri uygulamak mümkün değildir. Ne yazık ki çalışmamızdaki eksikliklerimizden biri lenfoma vakalarımızdaki fenotiplememizin yetersiz olmasıdır.

Literatürde bu özellikteki T hücreli lenfomalar dışında angiosentrik T hücreli lenfomalarda; angiomünoblastik LAP benzeri T hücreli lenfomalarda aradaki B hücrelerinde daha yüksek olmak üzere; CD30 (+) büyük hücreli lenfomalarda ve RS benzeri hücreler içeren B hücreli kronik lenfositik lösemilerde EBV saptanabildiği bildirilmiştir (2).

Bu çalışma EBV prevalansını belirlemek için yeterli vaka sayısını içermemektedir. Kullandığımız probun DNA olması sonuçlarımızı etkileyebileceğinden daha kesin bir yorum yapabilmek için vakalarımızın, daha duyarlı olan EBER in kullanılarak tekrar gözden geçirilmeleri uygun olacaktır. Ayrıca prospektif çalışılırken lenfomalarda immunfenotipleminin daha planlı yapılması gerekliliği ortadadır. Eksikliklerine rağmen çalışmamızın yeni çalışmalara başlangıç yapmamızda yararlı olacağı görüşündeyiz.

Yazışma Adresi: Dr Gülen AKYOL
İran Cad. 47/10
GOP ANKARA 06700

KAYNAKLAR

1. BROUSSET R, BUTET V., CHITTAL S., SELVES J., DELSOL G. Comparison of in Situ Hybridization Using Different Nonisotopic Probes For Detection of Epstein Barr Virus in Nasopharyngeal Carcinoma and Immunohistochemical Correlation with Anti Latent Membrane Protein Antibody. Lab Invest 67(4): 457-464, 1992.
2. CHAN K C J., TIMOTY TC., TSANG WYW., LAV WH., POON YF., WONG CSC., VICTOR WS. Detection of Epstein-Barr Viral RNA in Malignant Lymphomas of The Upper Aerodigestive Tract. Am J Surg Pathol 18(9): 938 - 946, 1994.
3. COTRAN R., KUMAR V., ROBBINS ST. Pathologic Basis of Disease. Saunders Company. 5th Edition, 1994.
4. ÇAVDAR A O., GÖZDAŞOĞLU S., YAVUZ G., BABCAN E., ÜNAL E., ULUOĞLU Ö., YÜCESAN S., MAGRATH IT., AKAR N. Burkitt's Lymphoma Between African and American Types in Turkish Children: Clinical, Viral (EBV) and Molecular Studies. Med Ped Oncol 21: 36-42, 1993.
5. DAMAJANOV V., LINDER J., ANDERSON'S PATHOLOGY, MOSBY, TENTH EDITION, VOL I, 1996, pp. 190-198.
6. DELVENNE P., KASCHTEN B., DENEUFBOURG JM., DEMANEZ L., STEVEKAERT A., REZNIK M., BONIVER J. Detection of Epstein-Barr Virus in A Case of Undifferentiated Nasopharyngeal Carcinoma by in Situ Hybridization with Digoxigenin-Labeled PCR Generated Probes. Virchow Arch A Pathol Anat 423: 145-150, 1993.
7. ERTEM U., DURU F., PAMİR A., TAÇ YILDIZ N., DAĞDEMİR A., AKÇAYÖZ A., ULUOĞLU Ö., TEZİÇ T. Burkitt's Lymphoma in 63 Turkish Children Diagnosed Over A 10 Year Period. Ped. Hematol Oncol 13: 123-134, 1996.
8. FEINMESSER R., MIYZAKT L., CHEUNG R., FREEMAN JL., NOYEK AM., DOSCH HM. Diagnosis of Nasopharyngeal Carcinoma by DNA Amplification of Tissue Obtained by Fine Needle Aspirate. N Engl J Med. 326: 17-21, 1992.
9. JAMES JF., SHURIN S., ABRAMOSWSKC et al. T Cell Lymphomas Containing Epstein Barr Viral DNA in Patients With Chronic Epstein Barr Virus Infection. N Eng J Med. 318: 733-741, 1988.
10. MURRAY PG., NIEDOBIOTEK G., KREMMER E., GRASSER F., REYNOLDS GM., CRUCHLEY A., WILLIAMS DM., MULLER LANTZSCH N, YOUNG LS. In Situ Detection of The Epstein Barr

Virus Associated Carcinomas. *J Pathol.* 178: 44-47, 1996.

11. RAAB - TRAUB N. EPSTAIN-BARR virus and Nasopharyngeal Carcinoma. *Semin Cancer biol.* 3: 297-307, 1992.
12. RATHMANATHAN R., PRASAD U., CHANDRIKA G., SADLER R., FLYNN K., RAAB-TRAUB N. Undifferentiated Nonkeratinizing and Squamous Cell Carcinoma of The Nasopharynx. Variants of Epstein Barr Virüs - Infected Neplasia. *Am J Pathol.* 146. 1355- 1367, 1995.
13. ROWLANDS DC. ITO M., MANGAHAM DC etal. Epstein Barr Virus and Carcinomas Rarc Association of The Virus With Gastric Adenocarcinomas. *Br J Cancer* 68; 1014-1019, 1993.
14. SAMOSZUCK M. RAPID Detection of Epstein-Barr Viral DNA by Nonisotopic in Situ Hybridization. Correlalion with The Polymerase Chin Reaction. *Am J Clin Pathol.* 96: 448-53, 1991.
15. SARIOĞLU S., PABUCÇUOĞLU U., KORKMAZ K. Nazofarenks Karsinomu ve Epstein-Barr Virüs Enfeksiyonu. XII. Ulusal Patoloji Kongresi Kitapçığı, 27 nolu bildiri, Ankara, 1996.
16. ŞAHİN A., KAZANDI A C., TARCAN B. Nazofarenks Karsinomlarında Retrospektif Analiz. XII: Ulusal Patoloji Kongresi Kitapçığı, 28 nolu bildiri, Ankara, 1996.
17. ŞAHİN A., BAYOL Ü. Nasofarenks Karsinomian ile Epstein - Barr Virüs İlişkisi. XII: Ulusal Patoloji Kongresi Kitapçığı, 235 nolu bildiri, Ankara 1996.
18. SUN Y., HEGMAYER G., CHEN Y J., HILDESHEIM A., CHEN IH., CAO Y., YA KT., COLBURN NH. An Infrequent Point Mutation of The p53 Gene in Human Nasopharyngeal Carcinoma. *Proc Nat Acad Sci USA* 89. 6525-6520, 1992.
19. TSANG WYW., CHAN JKC, TIMOTHY TC., WONG KF., POON YF., VICTOR WS. In Situ localization of Epstein Barr Virus Encoded RNA in Non Nasal / Nasopharyngeal CD56 Positive and CD56 Negative T Celi Lymphomas. *Hun Pathol* 25: 758-765, 1994.
20. TÜZÜNER N., İNCE Ü., YILDIZ İ., GÖÇENER S., ULUKUTLU L. Small Non-Cleaved Follicular Center Cell Lymphoma in Turkey Burkitt's and Non Burkitt's Types: A Retrospective Clinico Pathologic Analysis of 53 Cases in Pediatric Age Group. *Cancer* 59: 925-932, 1987.
21. WEISS LM, CHEN YY., LIV XF., Shibata D. Epstein Barr Virus and Hodgkin's Disease Acorrelative in Situ Hybridization and Polymerase Chain Reaction Study. *Am J Pathol.* 139: 1259-65, 1991.
22. WU TC., MANN RB., EPSTEIN JL., MCMAHON E., LE WA., Charache et al. Abundant Expression of EBER 1 Small Nuclear RNA in Nasopharyngeal Carcinoma A Morphologically Distictive Target for Detection of Epstein Barr Virus in Formalin Fixed Paraffin embedded Carcinoma Specimens. *Am J Pathol* 138. 1461-9, 1991.