



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

DERİ VE ZÜHREVİ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

MİKOZİS FUNGOİDESTE HHV-8 İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Sema İpek ALGAN

UZMANLIK TEZİ

BURSA-2014



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

DERİ VE ZÜHREVİ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

MİKOZİS FUNGOİDESTE HHV-8 İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Sema İpek ALGAN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Kenan AYDOĞAN

BURSA-2014

İÇİNDEKİLER

Özet	ii
İngilizce Özet	iii
Giriş	1
Mikozis Fungoides.....	3
Gereç ve Yöntem	14
Bulgular	19
Tartışma ve Sonuç	23
Kaynaklar.....	26
Ekler.....	29
Teşekkür.....	30
Özgeçmiş	31

ÖZET

Mikozis fungoides (MF), kutanöz T-hücreli lenfomaların en sık rastlanan tipidir. MF'in etyolojisi ve patogenezi büyük oranda bilinmemektedir. Genetik, çevresel ve immunolojik faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, insan herpes virüsü (HHV)-8'in kutanöz lenfoproliferatif hastalıklarda rolü olabileceği ortaya atılmıştır.

Bu çalışmada, viral etyolojinin de rolü olduğu düşünülen mikozis fungoides hastalarının deri biyopsilerinde HHV-8 DNA'sının polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile varlığının araştırılması planlanmıştır. Bu çalışma ile MF patogenezine açıklık getirmek amaçlanmıştır.

Çalışmaya mikozis fungoides tanısı konulmuş 40 olgu hasta grubu olarak, 10 psoriasis ve 10 atopik dermatit olgusu negatif kontrol grubu, 10 Kaposi sarkom hastası pozitif kontrol grubu olarak dahil edildi. Hasta ve kontrol gruplarına ait parafine gömülü lezyonlu deri örnekleri real-time PCR yöntemi ile HHV-8 DNA'sı açısından incelendi.

Pozitif kontrol grubu hastalarının tümünün deri biyopsisi örneklerinde HHV-8 DNA'sına rastlanırken, MF hastalarından ve negatif kontrol grubundan ise hiçbir hastanın parafine gömülü deri biyopsisi örneklerinde HHV-8 DNA'sı saptanmadı. Böylece, MF etyolojisinde HHV-8'in rolü olmadığı gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Mikozis Fungoides, insan herpes virüsü-8, polimeraz zincir reaksiyonu

SUMMARY

ASSESSMENT OF THE ROLE OF HHV-8 IN MYCOSIS FUNGOIDES

Mycosis fungoides (MF) is the most common form of cutaneous T-cell lymphomas. The etiology and the pathogenesis of MF is largely unknown. Genetic, environmental and immunological factors are thought to play a role in the pathogenesis. Some recent studies suggest that human herpes virus-8 (HHV-8) plays a role in cutaneous lymphoproliferative diseases.

In this study, we investigated the presence of HHV-8 DNA in the skin biopsies of patients with mycosis fungoides. We aimed to clarify the pathogenesis of MF by this study.

Forty mycosis fungoides patients as study group, 10 psoriasis and 10 atopik dermatitis patients as negative control group and 10 Kaposi sarcoma patients as positive control group were included in this study. Paraffin-embedded lesional skin biopsies of the patient and control groups were examined for HHV-8 DNA by real-time polymerase chain reaction method.

HHV-8 DNA was detected in the skin biopsy specimens of the all patients in the positive control group, whereas none of the skin biopsies of the patients in the negative control group or MF group were positive for HHV-8 DNA. Thus, it is shown that HHV-8 does not play a role in the etiology of MF.

Keywords: Mycosis fungoides, human herpes virus-8, polymerase chain reaction

GİRİŞ

Kutanöz T hücreli lenfoma (KTHL), değişik klinik bulgularla, histolojik görünümle, immünofenotip ve prognozlarla ortaya çıkan, deride yerleşmiş CD4⁺ CD45RO⁺ T hücrelerinin bir neoplazisidir. KTHLler tüm primer deri lenfomalarının %75-80'ini oluşturur. Primer kutanöz lenfomaların, diğer bölgelerde ortaya çıkan lenfomalara karşı en önemli avantajı gözle görünür ve kolayca biyopsi yapılabilir olmasıdır. Bu yüzden, dermatologlar bu hastalıkların tanısında, sınıflandırılmasında ve tedavisinde anahtar rol oynarlar (1,2).

Derinin primer T-hücreli lenfomaları ektranodal Hodgkin-dışı lenfomaların bir alt grubudur ve tanı anında iç organ tutulumu olmadan sadece deride yer alabilirler (3).

Primer kutanöz lenfomaların şu anki sınıflandırılması Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Avrupa Kanseri Araştırma ve Tedavisi Organizasyonu'nun (EORTC) birlikte çalışması sonucu ortaya çıkmış ve 2005 yılında "Kutanöz Lenfomaların WHO-EORTC Sınıflandırması" adıyla yayınlanmış ve 2008 yılında WHO tarafından "Hematopoetik ve Lenfoid Doku Tümörlerinin WHO Sınıflandırılması" başlığıyla değiştirilmiştir. WHO-EORTC sınıflandırması, primer kutanöz lenfomaları iki büyük gruba ayırmaktadır: deride yerleşmiş T lenfositlerinden köken alan "kutanöz T hücreli lenfomalar" ve B lenfositlerinden köken alan kutanöz B hücreli lenfomalar (KBHL). Ek olarak doğal öldürücü (NK) hücrelerden köken alan lenfomalar ve tanımlanamamış fenotipik özelliklere sahip, sınıflandırmada geçici olarak gruplandırılan lenfomalar da bulunmaktadır (Tablo-1) (4).

Tablo-1: Primer kutanöz bulgular ile ortaya çıkan kutanöz lenfomaların WHO-EORTC sınıflandırması (4).

Kutanöz T hücre ve NK hücreli lenfomalar
Mikozis Fungoides
MF varyantları ve alt tipleri
Folikülotropik MF
Pajetoid retiküloz
Granulomatöz gevşek deri
Sezary sendromu
Erişkin T-hücreli lösemi/lenfoma
Primer kutanöz CD30+ lenfoproliferatif hastalıklar
Primer kutanöz anaplastik büyük hücreli lenfoma
Lenfomatoid papülozis
Subkutan pannikülit benzeri T-hücreli lenfoma
Ekstranodal NK/T-hücreli lenfoma, nazal tip
Primer kutanöz periferel T-hücreli lenfoma, belirlenmemiş
Primer kutanöz agresif epidermotropik CD8+ T-hücreli lenfoma (geçici)
Kutanöz γ/δ T-hücreli lenfoma
Primer kutanöz CD4+ küçük/orta-boyutlu pleomorfik T-hücreli lenfoma (geçici)
Kutanöz B-hücreli lenfomalar
Primer kutanöz marjinal zon B-hücreli lenfoma
Primer kutanöz follikül merkezi lenfoma
Primer kutanöz diffüz büyük B-hücreli lenfoma, bacak tipi
Primer kutanöz diffüz büyük B-hücreli lenfoma, diğer
İntravasküler büyük B-hücreli lenfoma
Öncül hematolojik neoplaziler
CD4+/CD56+ hematodermik neoplazi (blastik NK-hücreli lenfoma)

WHO-EORTC: Dünya Sağlık Örgütü- Avrupa Kanseri Araştırma ve Tedavisi Organizasyonu

MF: Mikozis Fungoides

NK hücre: Doğal öldürücü hücre

Kutanöz T-hücreli lenfomalar nadir görülen bir grup hastalığı içerse de en sık görülen alt tipler mikozis fungoides ve Sezary Sendromu'dur. Bu iki hastalık tüm primer lenfomaların %70-75'ini oluşturmaktadır (5).

Mikozis Fungoides

Mikozis fungoides (MF), KTHLLerin en sık rastlanan tipidir ve tüm primer kutanöz lenfomaların %50'sini oluşturmaktadır. Mikozis fungoides, genellikle CD4⁺ fenotipinde küçük-orta boyutlu lenfositlerin bir neoplazisidir (3).

Mikozis fungoides, nadir bir hastalık olup insidansı 3/1.000.000'dir. Genellikle yaşlı erişkinlerde görülmekle birlikte (medyan tanı yaşı: 55-60 yaş) çocuklarda ve gençlerde de gelişebilmektedir. Erkeklerde kadınlara oranla (E/K: 1.6-2.0:1) ve siyahi ırkta beyazlara göre (2 katı sık) daha sık görülmektedir. MF, genellikle yıllar ve dekatlar süren ilerlemeyle masum bir seyir gösterse de, bazen bu seyir öngörülemez. Başlangıçta sadece deriyi etkiler ve epidermotropizm gözlenir fakat, evresine bağlı olarak zaman içerisinde lenf nodlarına, kana ve iç organlara yayılabilir (1,3).

Tipik olarak, klasik MF hastaları yama evreden plak evreye ve son olarak da tümöral evreye ilerleme gösterirler ve yıllar, hatta dekatlar süren uzun bir klinik seyirleri vardır. MF'in bu 3 klasik evresi 1876 yılında Bazin tarafından tanımlanmıştır. Bu üç fazın her biri hastalığın seyri boyunca görülebilir ve genellikle örtüşür ya da aynı anda ortaya çıkabilir (1,3).

Kesin tanı konulmadan önce, hastaların büyük kısmı, hastalığa özgü olmayan, şiddetli kaşıntılı, ekzematöz ya da psoriaziform deri lezyonları ve kesin tanı vermeyen deri biyopsileri ile yıllarca zaman kaybederler. Deri lezyonlarının başlangıcından MF tanısı konulana kadar birkaç ay ile 5 dekattan daha uzun (ortalama 4-6 yıl) zaman geçebilir (1,3).

Histopatolojik inceleme hastalığın evresine göre değişkenlik gösterir ve klasik erken evre lezyonların mikroskopik bulguları neoplastik olmayan dermatozlar ile karıştırılabilir (1,3).

Erken yama lezyonlarda özellikle lenfositlerden oluşan, epidermiste sınırlı (epidermotropizm), yüzeysel bant tarzı ya da likenoid infiltrasyon gözlenir; bazen hiperkromatik nükleuslu, oldukça kıvrık (serebriform), küçük-orta boyutlu atipik lenfositler saptanabilir. Bu lenfositler, tipik olarak, vakuollü halolar ile çevrilmiş tek hücreler halinde, lineer bir konfigürasyon göstererek epidermiste bazal tabakasında kolonize olurlar. Epidermiste akantoz, hiperkeratoz ya da bazal tabaka hasarı (pigment düşmesi) ve ödem görülebilir. Postkapiller venüllerde belirginleşme ve eozinofiller, makrofajlar ve dermal dendritik hücrelerden oluşan infiltratlar gözlenebilir. Papiller dermal fibroz bulunabilir. İnfiltrasyonun yoğunluğu değişkendir ve lezyon gelişip plak lezyonlara benzemeye başladıkça artar. Tipik plaklarda ise epidermotropizm çok belirgindir. İntraepidermal atipik hücre birikintilerinin (Pautrier mikroapseleri) varlığı tanı için oldukça özgü olmasına rağmen vakaların sadece üçte birinde görülür. Epidermiste akantoz, uzamış, psoriaziform rete sırtları gözlenebilir, fakat, spongiyoz genellikle yoktur ya da çok azdır. Serebriform nükleuslu lenfositlerden oluşan yoğun bir subepidermal bant tarzı infiltrasyon gözlenir. Dermal infiltrasyon daha belirgindir; serebriform nükleuslu atipik hücreler, yer yer blast hücreleri ve bu hücrelerle karışmış eozinofiller ile plazma hücrelerinden oluşur (1,3).

Tümöral evrede, dermal infiltrasyon tüm dermisi kaplayabilir ve subkutan dokuya yayılabilir. Bu evreden sonra epidermotropizm gözlenmez. Reaktif T lenfositleri ve dendritik hücrelerin sayısında azalma meydana gelir. Tümör hücreleri sayıca ve boyut olarak artarlar ve değişik oranlarda serebriform nükleuslu küçük, orta ya da büyük hücreler, belirgin nükleuslu blast hücreleri ve ara formlar gözlenebilir. CD30⁻ ya da CD30⁺ diffüz büyük T-hücreli lenfomaya dönüşüm gözlenebilir ve bu durumda prognoz oldukça kötüdür (1,3).

Klinik olarak erken yama evre MF'te tipik olarak, kaşıntılı, değişik boyutlarda, eritemli, ince skuamlı yamalar gözlenmektedir (Şekil-1). Bu erken dönemde değişik derecelerde atrofi gözlenebilmekte ve alacalı hipo-hiperpigmentasyon, atrofi ve telenjektaziden oluşan poikilodermik görünüm (poikiloderma vasculare atrophicans=PVA) (Şekil-2) oluşabilmektedir.

Başlangıçtaki deri lezyonları kalçalarda, gövde ve ekstremitelerin diğer örtülü yerlerinde yerleşme eğilimi gösterirler. Yamalar progresyon gösterir ve annüler, polisiklik ve tipik at nalı şeklinde konfigürasyon gösterebilen, giderek büyüyen, kenarları daha infiltrate, kırmızımsı-kahverengi, skuamlı plaklar gelişir (Şekil-3). Plakların kenarları epidermal hiperplaziye ya da önemli derecedeki neoplastik lenfositik infiltrata bağlı olarak elevedir. Plaklar mevcut yamalardan ya da *de novo* gelişebilir. Yüzde oluşan infiltratif plaklar “aslan yüzü” görünümüne ve kıllı bölgelerde ortaya çıkanlar alopesiye ya da kistlere neden olabilir. Bunun yanında, derinin neoplastik hücreler ile diffüz infiltrasyonu sonucu eritrodermi gelişebilir (1,6).



Şekil-1. Erken yama evre mikozis fungoides. Kruriste yerleşmiş eritemli, flu sınırlı, ince skuamlı yama gözleniyor. (*Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıkları Arşivinden*)

Hastaların çoğunda “plak evre”ye geçiş gözlenmez ve hastalık yama evre ile sınırlı kalır. Buna karşın, bir grup hastada nodüller ve tümörler gelişir (Şekil-4). Tümörler genellikle morumsu renkli, ekzofitik ve mantar-şekillidir ve tercihen yüzü ve vücut kıvrımlarını etkiler. Tümöral evre MF’li hastalarda tipik olarak yamaların, plakların ve tümörlerin bir arada olduğu gözlenir ve tümörlerde sıklıkla ülserasyon, nekroz ya da sekonder enfeksiyonlar meydana gelir. Bu evrede kaşıntının şiddeti azalabilir (1,6).



Şekil-2: Poikiloderma atroficans vaskürel bir hasta. Sigara kağıdı benzeri atrofik deri, hipo ve hiperpigmentasyon ve yer yer telenjektaziler izleniyor. (Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıkları Arşivinden)



Şekil-3: Plak evre mikozis fungoides. Sırt bölgesinde bazılarının üzeri hafifçe skuamlı, morumsu renkli plaklar izleniyor. (Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıkları Arşivinden)

MF'ten kaynaklanan ölümlerin %50'sinden fazlası *Staphylococcus aureus* ya da *Pseudomonas aeruginosa* sepsisi nedeniyle gerçekleşmektedir. Tümörler, KTHL'nin, daha agresif seyirli CD30⁺ büyük-hücreli anaplastik varyantına dönüşebilirler. Primer CD30⁺ anaplastik büyük-hücreli

lenfomaların aksine MF ile ilişkili olarak sekonder gelişen CD30⁺ lenfomaların (büyük hücre transformasyonu) prognozu oldukça kötüdür ve medyan sağkalım 11 ile 36 ay arasında değişir (1,6).



Şekil-4. Tümöral evre mikozis fungoides. Sırtta ve kalçalarda yaygın nodüller gözlenmekte. (Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıkları Arşivinden)

Ekstrakutanöz hastalık geliştirme riski, hastalığın yaygınlığı ve deri lezyonlarının tipi ile yakından ilişkilidir. Bu durum, sınırlı yama/plak evre hastalıkta oldukça nadir iken, yaygın plaklı hastalarda nispeten daha sık, deri tümörleri ve eritrodermili hastalarda ise en siktir. Ekstrakutanöz hastalık, istisnasız, öncelikle yoğun deri tutulumunun olduğu bölgeyi drene eden bölgesel lenf nodlarında gözlenir. Sonrasında organ tutulumu gözlenebilir ve herhangi bir organı etkileyebilir. Kemik iliği nadiren etkilenmektedir (1,6).

Her ne kadar MF ve Sezary Sendromu (SS), Hodgkin dışı lenfomaların tipleri olsalar da, bu hastalıklarda deri bulgularına ve deri dışı hastalık bulgularına dayanarak farklı sınıflandırma ve evreleme sistemleri kullanılmaktadır (Tablo-2, Tablo-3) (7).

Tablo-2: Kutanöz T-hücreli Lenfomalarda Evreleme (7).

Klinik evre	T	N	M	B
IA	T ₁	N ₀	M ₀	B ₀₋₁
IB	T ₂	N ₀	M ₀	B ₀₋₁
IIA	T ₁₋₂	N ₁₋₂	M ₀	B ₀₋₁
IIB	T ₃	N ₀₋₂	M ₀	B ₀₋₁
III	T ₄	N ₀₋₂	M ₀	B ₀₋₁
IVA ₁	T ₁₋₄	N ₀₋₂	M ₀	B ₀₋₁
IVA ₂	T ₁₋₄	N ₃	M ₀	B ₀₋₁
IVB	T ₁₋₄	N ₀₋₃	M ₁	B ₀₋₁

Tablo-3: Kutanöz T-hücreli lenfomalarda TNM Sınıflandırması (7).

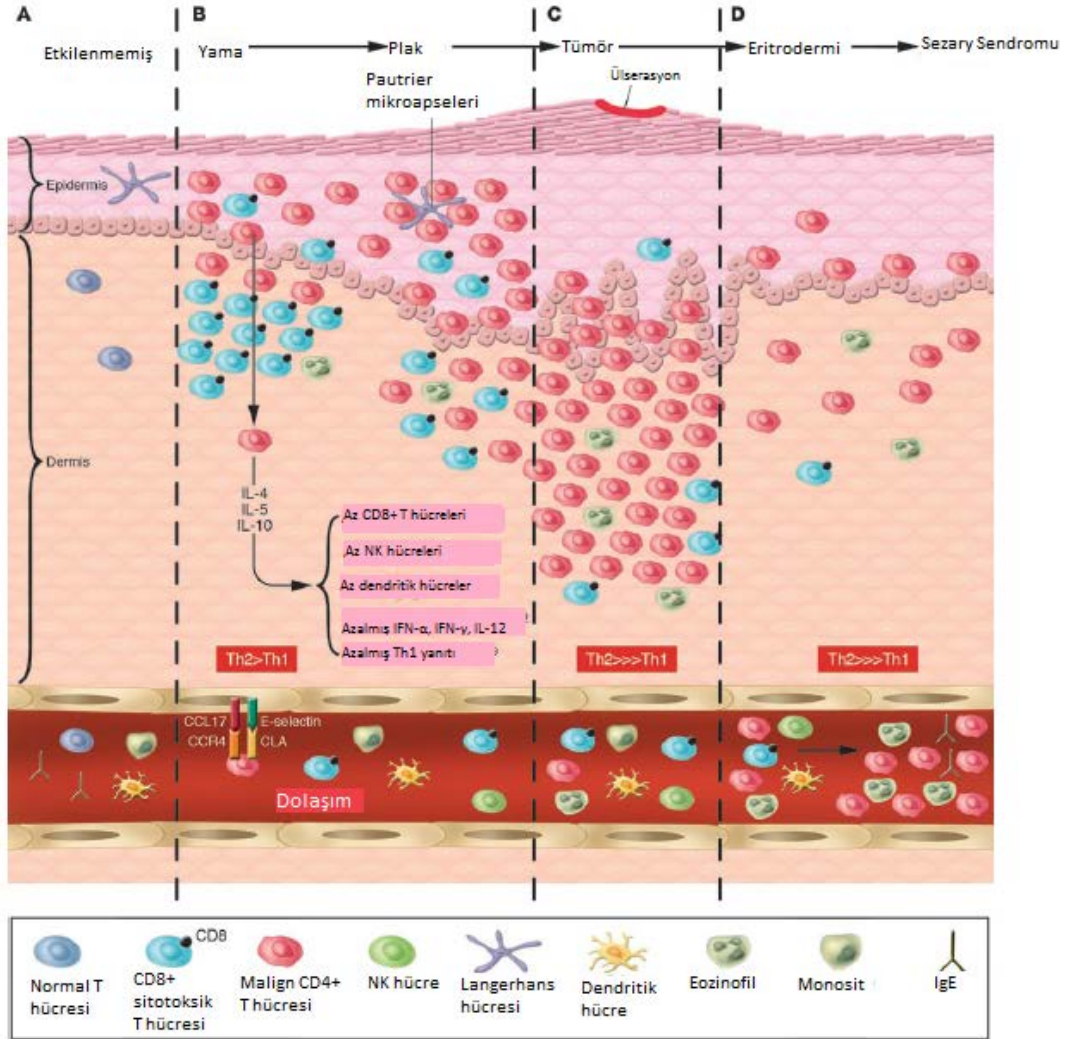
Sınıflandırma	Tanımlama
T: Deri	
T ₀	Klinik ve/veya histopatolojik olarak şüpheli lezyonlar
T ₁	Deri yüzey alanının %10'undan azını kaplayan papüller, plaklar ya da ekzematöz yamalar
T ₂	Deri yüzey alanının %10'undan fazlasını kaplayan papüller, plaklar ya da ekzematöz yamalar
T ₃	Bir ya da daha fazla tümör
T ₄	Eritrodermi
N: Lenf nodları	
N ₀	Klinik olarak anormal periferik lenf nodu yok; patoloji KTHL açısından negatif
N ₁	Klinik olarak anormal periferik lenf nodu var; patoloji KTHL açısından negatif
N ₂	Klinik olarak anormal periferik lenf nodu yok; patoloji KTHL açısından pozitif
N ₃	Klinik olarak anormal periferik lenf nodu var; patoloji KTHL açısından pozitif
B: Periferik kan	
B ₀	Dolaşımda atipik hücreler yok (<%5)
B ₁	Dolaşımda atipik hücreler var (>%5); total beyaz küre ve total lenfosit sayılarını ve 100 lenfositteki toplam atipik hücre sayısını kaydedin
M: İç organlar	
M ₀	İç organ tutulumu yok
M ₁	İç organ tutulumu (Patolojik doğrulama yapılmalı ve etkilenen organ kaydedilmeli)

KTHL: Kutanöz T-hücreli lenfoma

Mikozis fungoidesin kademeli progresyonunun etyolojisi ve patogenezi büyük oranda bilinmemektedir. Genetik, çevresel ve immunolojik etkenlerin rol oynadığı düşünülmektedir (Şekil-5) (1,8).



Genetik faktörler
İmmünojik faktörler
Çevresel faktörler



Şekil-5: MF progresyonunda derinin mikroçevresi. (A) Normal deride, epidermiste yerleşik Langerhans hücreleri ve dermis ve dolaşımdaki T hücreleri. (B) MF'in yama ve plak evrelerinde epidermiste yerleşerek Langerhans hücreleri etrafında toplanan CD4⁺ T hücreleri. (C) Tümöral MF'te tümör dermis ve subkutan dokuyu kaplar ve temel olarak malign T hücrelerinden ve az miktarda CD8⁺ T hücrelerinden oluşur. (D) Eritrodermik MF ve Sezary Sendromunda dolaşımda, Th2 sitokinleri salarak CD8⁺ T hücreleri, doğal öldürücü hücreler ve dendritik hücrelerin sayı ve fonksiyonlarını ve dolayısıyla konak immün yanıtını etkileyen malign T hücreleri (8 numaralı kaynaktan uyarlanmıştır).

Genetik Etkenler

Lenfomagenez; klonal proliferasyon, malign transformasyon ve en sonunda yaygın hastalıkla sonuçlanan birçok genetik anomalinin kademeli eklenmesiyle oluşan multifaktöryel bir süreçtir. Her ne kadar, tümör progresyonundaki klinik basamaklar yüz yıl önce tanımlanmış olsa da, bu basamakların altında yatan moleküler olaylar halen tanımlanabilmiş değildir. MF ve Sezary Sendromlu hastalarda dengesiz translokasyonlar ve sayısal ve yapısal anomaliler gibi kromozomal sapmalar belirlenmiş fakat hasta heterojenitesi nedeniyle bu verilerin yorumlanması güç olmuştur. MF'li hastalarda birçok genetik anomali rapor edilmiş fakat, kalıcı bir patern ortaya çıkmamıştır (1). Yakın zamanda Carbone ve ark.'nın (9) yaptığı bir çalışmada erken yama evre MF'li hastalarda kromozom 19 monozomisi; tekrarlayan 7p22.1-p22.3, 7q11.1-q11.23, 9q34.12, 12q24.31 ve 16q22.3-q23.1 kayıpları; 8q22.3-q23.1 kazanımı ve BCL7A, SMAC/DIABLO ve RHOV tümör supresör genlerinde silinmeler saptanmıştır. Karenko ve ark.larının (10) yaptığı bir çalışmada NAV3 genini kodlayan 12q21-22 bölgesinde silinmeler olduğu ortaya konulmuştur. NAV3 geni nükleer transport, kinetokor oluşumu ve hücre döngüsünün kontrolünde görev alarak tümör supresör gen görevi görür.

İmmunolojik Etkenler

Yakın zamanda yapılan çalışmalar, CD8⁺ sitotoksik T hücrelerinin (STH) MF'teki antitümöral yanıtta kritik bir rol oynadığını göstermiştir. Dermal infiltratlardaki yüksek CD8⁺ STH yüzdesi ile sağ kalımın artması arasında bir ilişki tanımlanmıştır (11). Bu CD8⁺ T hücreleri, antitümöral etkilerini, hem doğrudan sitotoksik etki, hem de özellikle interferon (IFN)- γ olmak üzere sitokin üretimi yoluyla göstermektedirler. Tümör hücresi lizisini perforin, granzim ve T-hücresine sınırlı intraselüler antijen (TIA-1) içeren sitotoksik granüllerin ekzositozu ve neoplastik T hücrelerinde Fas (CD95; APO-1) ile reaksiyona giren Fas ligand (FasL) ekspresyonu ile sağlamaktadırlar. Her iki yolak da, kaspaz 3 aktivasyonuna ve apoptozis yoluyla tümör hücresi ölümüne yol açmaktadır. Neoplastik T hücrelerinde Fas ekspresyonunun ya

da fonksiyonunun kaybı, tümör hücrelerinin antitümöral yanıtta kaçma mekanizmalarından biridir (12).

Ancak, malign T hücrelerinin otonom çoğalma potansiyeli olmadığı ve CD28 uyarımı gerektirdiğine dair hipotezler ortaya atılmıştır. MF'in histopatolojik incelemesinde hem malign CD4⁺ hem de reaktif CD8⁺ T hücrelerine rastlanmaktadır. Hastalığın erken evresinde yardımcı T hücresi (Th) 1 sitokin paterni baskın iken ilerleyen evrelerde CD4⁺ T hücrelerinde ve Th2 de artış meydana gelir. Bu durum CD8-aracılı immun yanıtın kaybının hastalığın ilerlemesinde rol oynadığını düşündürmektedir (5).

T hücrelerini azaltan faktörler ise kutanöz lenfosit antijeni (CLA) ve E-selektin için ligandın (CD62E) kutanöz ekspresyonudur. Bunun dışında CCR4, CCR10 ve sırasıyla ligandları CCL17/TARC ve CCL27/CTACK gibi adezyon molekülleri ve kemokinler de T hücrelerini azaltmaktadır (5).

Erken evre MF'te Th1 sitokinleri olan IFN- γ , interlökin (IL)-12 ve IL-2 seviyesinde artış mevcut iken, hastalık ilerledikçe Th1 sitokinleri azalır ve IL4, IL5, IL10 ve IL13 gibi Th2 sitokinleri hakim olur. Th2 sitokinlerinin seviyesindeki artış, Th1-hücre aracılı antitümöral yanıtı bozabilir ve ileri evre MF hastalarında görülen immunsupresyona yol açabilir (5).

Çevresel Etkenler

Mikroorganizmalar ile sürekli antijenik uyarımın, MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) lenfomalar (Örn *Helicobacter pylori* enfeksiyonu), kutanöz B hücreli lenfoma (Örn *Borrelia burgdorferi* enfeksiyonu) ve enteropati tipi T-hücreli lenfoma (Örn Celiac hastalığı) gibi çeşitli malign lenfomaların gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca MF'te, ısrarcı antijenik uyarım başlangıç olayı olarak kabul edilmektedir; fakat yer alan antijen(ler)in doğası bilinmemektedir (1). Geniş vaka-kontrol çalışmalarında endüstriyel ve çevresel etkenler ile MF gelişimi arasında ilişki saptanmamıştır (13). Buna rağmen, erişkin T-hücreli lösemi/lenfomada insan T-hücreli lenfoma virüsü 1'in (HTLV-1) ve ektranodal NK/T-hücreli lenfoma, nazal tipte *Ebstein-Barr virus* (EBV)'ün etyolojik rolü olduğu kanıtlanmıştır; bu virüslerin MF'te primer etyolojik rollerine ilişkin kanıt ise yetersizdir (14,15). Diğer epidemiyolojik çalışmalar, bir enfeksiyöz kaynağın varlığını öne

sürmektedir. KTHL'nin hem görülme sıklığı hem de mortalite riski yaşlı popülasyonda en yüksektir. Yaşlılardan başka, KTHL, diğer immunsuprese durumlarda beklenenden çok daha sık ortaya çıkmaktadır. Organ transplantasyonunu takiben görüldüğü bildirilmiştir ve bu hastalarda daha agresif seyir gösterir. KTHL'li deri ve kan örneklerinde değişik virüslerin nükleik asit ve protein içeriklerini araştıran önceki çalışmaların sonuçları oldukça karışıktır. Bazı çalışmalarda stafilokokkal süperantijenlerin de MF gelişimini tetikleyebileceği öne sürülmüş fakat kesin sonuçlar elde edilememiştir. Bu tutarsız bulguların açıklamaları, değişik kontaminasyon formları (Ör: PCR reaksiyonlarının viral genomik kontaminasyonu); virüs-ile ilişkili kanserlerin (Ör: erişkin T-hücreli lösemi/lenfoma) KTHL olarak yanlış tanısı ve varolan moleküler ve immunolojik tanı tekniklerinin kısıtlılığı olabilir. Bunun yanında, çalışmaların çoğunda retrovirüsler ve herpesvirüsler ile olası ilişkiler saptanmıştır (16).

İnsan herpes virüsü (HHV)-8, Kaposi Sarkomu, Primer Efüzyon Lenfoması ve Multisentrik Castleman Hastalığı'na yol açtığı bilinen bir gammaherpesvirüstür. Diğer herpesvirüsler gibi HHV-8 de, hücre içinde epizom şeklinde latent evrede kalabilir ve ultraviyole ışığı ya da immunosupresif tedavi ile reaktive olabilir (17). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, HHV-8'in kutanöz lenfoproliferatif hastalıklarda rolü olabileceği ortaya atılmıştır (18-20). 1997 yılında, Henghold ve ark.'nın (21) yaptığı bir çalışmada, deri biyopsileri üzerinde yapılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile MF hastalarının hiçbirinde HHV-8 DNA'sına rastlanmamıştır. Dupin ve ark.ları (22) da benzer sonuçlar elde etmişlerdir. 2000 yılında, Nagore ve ark.'nın (18) benzer bir yöntemle primer kutanöz lenfomalı hastalar üzerinde yaptığı bir çalışmada, MF hastalarının %24'ünde Epstein Barr virüs (EBV), %14'ünde insan herpes virüsü 7 (HHV-7) DNA'sı pozitif saptanırken, hastalarının hiçbirinde HHV-8 DNA'sına rastlanmamıştır. 2005 yılında Trento ve ark.'ları (19), büyük plak parapsoriasis ve MF gibi lenfoproliferatif hastalığı olan 22 kişilik bir İtalyan topluluğunda HHV-8 enfeksiyonu varlığını araştırmışlardır. Sonuçta büyük plak parapsoriasis hastalarında HHV-8 seroprevalansı %100 bulunurken, MF'li hastalarda bu oran %25 olarak

bulunmuştur. Seronegatif MF hastalarının hiçbirisinde *nested* PCR yöntemiyle deri biyopsileri ve periferik kan mononükleer hücrelerinde HHV-8 DNA'sına rastlanılmazken, seropozitif olan 3 hastanın 2 sinde periferik kan mononükleer hücreleri içerisinde HHV-8 DNA'sına rastlanmıştır. Bu iki hastadan da sadece birinden alınan deri biyopsisinde *nested* PCR yöntemi ile HHV-8 DNA'sı pozitif bulunmuştur. 2008 yılında Kreuter ve ark.'nın (20) yaptığı çalışmada ise MF'li hastaların deri biyopsilerinde *nested* PCR yöntemi ile HHV-8 DNA'sı pozitif bulunurken, latentlik ile ilişkili nükleer antijen (LANA) işaretçi olarak kullanılarak yapılan immunohistokimyasal boyamada HHV-8 saptanamamıştır. Bunun yanında, ileri evre hastalığa ya da uzun dönem tedaviye bağlı olarak ortaya çıkan immun baskılanma sonucu HHV-8'in, kutanöz T hücreli lenfomanın ilerlemesinde kofaktör olarak rol oynadığı düşünülmektedir (20).

Bu çalışmada, viral etyolojinin de rolü olduğu düşünülen MF hastalarının deri biyopsilerinde HHV-8 DNA'sının polimeraz zincir reaksiyonu ile varlığının araştırılması ve MF patogeneziindeki rolünün irdelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Haziran 2011 ve Nisan 2013 tarihleri arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıkları polikliniğine başvuran ve klinik, histopatolojik ve immunohistokimyasal bulgularla, EORTC (4) kriterlerine uygun olarak Mikozis fungoides tanısı konulmuş 40 olgu **hasta grubu** olarak dahil edildi. Histopatolojik olarak tanı konulmuş 10 gönüllü psoriasis ve 10 gönüllü atopik dermatit olgusu **negatif kontrol grubu**, 10 Kaposi sarkomu hastası **pozitif kontrol grubu** olarak çalışmaya dahil edildi. MF dışında immunosupresyon yaratacak hastalık bulunması (Örn AIDS) dışlanma kriteri olarak kabul edildi.

Mikozis fungoides hastalarının genellikle bölümümüzde yapılmış birden çok deri biyopsileri bulunduğundan, kesin mikozis fungoides tanısı veren ilk deri biyopsileri çalışmaya alındı.

Hasta ve kontrol gruplarına ait parafine gömülü lezyonlu deri örnekleri Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden temin edildi.

Çalışma öncesinde Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alındıktan sonra (31 Mayıs 2011 tarih ve 2011-12/2 nolu karar ile onay alınıp; 17 Aralık 2013 tarih ve 2013-21/20 nolu karar ile çalışmada değişiklik yapılmıştır) çalışma kriterlerine uygun olarak çalışmaya alınan tüm olgulara Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu imzalatıldı.

Deparafinizasyon ve DNA Ekstraksiyonu

Parafine gömülü örneklerin deparafinizasyonu ve DNA eldesi için QIAamp DNA Mini ve Kan Mini Kiti (Maryland, ABD) kullanılarak ekstraksiyon protokolü üretici firma önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

İşlem Basamakları:

1. 25 mg parafin içerisindeki doku santrifüj tüplerine aktarıldı.
2. 1200 µL ksilen eklendi, vortekslendi.
3. Oda ısısında 5 dk boyunca en yüksek devirde santrifüj edildi.

4. Supernatan pipet yardımıyla ayrıldı.
5. Kalan ksileni ayırmak için 1200 µL %100 etanol eklendi ve çalkalandı.
6. Oda ısısında 5 dk boyunca en yüksek devirde santrifüj edildi.
7. Etanol pipet yardımıyla dikkatlice alındı ve atıldı.
8. 5.-7. basamaklardaki işlemler bir kez daha tekrarlandı.
9. Tüpler 10-15 dk boyunca etanol buharlaşana kadar 37⁰C'de bekletildi.
10. Doku pelleti 180 µL ATL tamponu içerisinde süspense edildi.
11. 20 µL proteinaz K eklendi, vortekslenerek karıştırıldı ve doku tamamen lizise uğrayana kadar 56⁰C'de inkübe edildi.
12. Kapağın iç kısmındaki damlaları uzaklaştırmak amacıyla 1.5 mL tüp kısa bir süre santrifüj edildi.
13. Örneğe 200 µL AL tamponu eklendi, puls-vorteksleme ile 15 saniye karıştırıldı ve 70⁰C'de 10 dakika inkübe edildi. Kapağın iç kısmındaki damlaları uzaklaştırmak amacıyla 1.5 mL tüp kısa bir süre santrifüj edildi.
14. Örneğe 200 µL etanol eklendi, 15 saniye boyunca puls-vorteksleme ile karıştırıldı. Karıştırdıktan sonra kapağın iç kısmındaki damlaları uzaklaştırmak amacıyla 1.5 mL tüp kısa bir süre santrifüj edildi.
15. Karışım QIAamp Mini spin kolonuna (2 mL toplama tüplerinde) dikkatlice aktarıldı. 8000 rpm de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. QIAamp Mini spin kolonu temiz bir 2 mL toplama tüpüne konuldu ve filtratı içeren tüp atıldı.
16. 500 µL AW1 tamponu eklenerek 8000 rpm de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. QIAamp Mini spin kolonu tekrar temiz bir 2 mL toplama tüpüne konuldu ve filtratı içeren tüp atıldı.
17. 500 µL AW2 tamponu eklenerek 14000 rpm de 3 dakika boyunca santrifüj edildi.
18. QIAamp Mini spin kolonu temiz bir 2 mL toplama tüpüne konuldu ve filtratı içeren eski tüp atıldı. 18000 rpm de 1 dakika boyunca santrifüj edildi.
19. QIAamp Mini spin kolonu temiz bir 1.5 mL toplama tüpüne konuldu ve filtratı içeren eski tüp atıldı. 200 µL AE tamponu eklendi. Oda

sıcaklığında 1 dakika boyunca inkübe edildikten sonra 8000 rpm de 1 dakika boyunca santrifüj edildi.

20. Bir önceki basamak tekrar edildi.

21. Örnekler PCR uygulanana kadar –20°C’de saklandı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Protokolü

Polimeraz zincir reaksiyonu in vitro enzimatik sentez yolunu kullanarak belirli DNA dizilerinin amplifikasyonu amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Böylece birkaç saat içerisinde yaklaşık 100 milyar kopya elde edilebilir. PCR sürecinde, öncelikle, genomik DNA sıcaklığın etkisiyle denature edilir ve çift zinciri tek zincir haline gelir. Sonrasında oda ısısında ilgili primerler tek-sarmallı DNA’nın ilgili primer bölgesine yapışır. Takiben DNA polimeraz enzimi primerler 3’ bölgesine bağlanır ve ortamdaki dört deoksinükleotid trifosfatın (adenin, guanin, sitozin, timin) yeni zincire eklenmesi sonucunda ilgili gen bölgeleri çoğaltılır (23).

Bu çalışmada deri dokusu örneklerinden elde edilen DNA’da insan herpes virüsü (HHV)-8 DNA’sı arandı. Bunun için PrimerDesign™ genesig Kit (Birleşik Krallık) kullanıldı. Kit, aynı zamanda pozitif kontrol kalıbı da içermekteydi. Negatif kontrol olarak da RNAz/DNAz içermeyen su kullanıldı. Böylece işlemin güvenilirliği her çalışmada test edildi. Yabancı DNA ile kontaminasyonu engellemek amacıyla pipetleme işlemi PCR laboratuvarında biyogüvenlik kabininde gerçekleştirildi.

Real-Time PCR Prosedürü İşlem Basamakları:

1. Kit içerikleri aşağıdaki tabloya göre, içerilerine yanlarında belirtilen hacim kadar RNAse/DNAse içermeyen su konularak hazırlandı (Tablo-4)

Tablo-4: Kit içeriklerinin sulandırılması.

İçerik	Hacim
HHV8 Primer/Probe karışımı	165 µL
İnternal ekstraksiyon kontrol primer/prob karışımı	165 µL
Endojen ACTB primer/prob karışımı	165 µL
İnternal kontrol DNA	600 µL
Pozitif kontrol şablonu	500 µL

2. Aşağıdaki tabloya göre HHV-8 tanıma karışımı hazırlandı (Tablo-5).

Tablo-5: HHV-8 tanıma karışımının hazırlanması (belirtilen hacimler sadece bir örnek içindir).

İçerik	Miktar
Lightcycler Fast Start DNA Master Hyb Probe 10 x	2 µL
HHV8 Primer/Probe mix	1 µL
İnternal ekstraksiyon kontrol primer/prob karışımı	1 µL
RNAse/DNAse içermeyen su	11 µL
Toplam hacim	15 µL

3. Her kuyucuğa bu karışımdan 15 µL konuldu.
4. Tüm örnekler için RNAse/DNAse içermeyen su içerisinde örnek DNA şablonları (5 ng/µL) hazırlandı.
5. Her kuyucuğa 5 µL dilue DNA şablonu konuldu. Negatif kontrol kuyuları için 5 µL RNAse/DNAse içermeyen su kullanıldı. Her kuyucuktaki toplam hacim 20 µL oldu.
6. Standart eğri dilüsyon serilerinin hazırlanması
 - a. 900 µL RNAse/DNAse içermeyen su pipet ile çekilerek 5 tüpün içerisine kondu ve 2'den 6'ya kadar numaralandırıldı.
 - b. 100 µL pozitif kontrol şablonu 2 numaralı tüpe konuldu.
 - c. Vortekslendi.
 - d. Pipet ucu değiştirilerek 2. tüpten 3. tüpe 100 µL çekildi.
 - e. Vortekslendi.
 - f. Dilüsyon serilerini tamamlamak için son iki basamak, 6. tüpe kadar bir önceki tüpten pipetle alınarak tekrarlandı.

Bu işlem sonunda pozitif kontrol şablonu olarak kullanılan tüplerde farklı miktarlarda DNA kopyası elde edildi (Tablo-6).

7. Her kuyucuğa 5 µL standart şablon konuldu.

Tablo-6: Dilüsyon serilerindeki DNA kopya sayıları.

Standart eğri	Kopya sayısı
Tüp 1 (pozitif kontrol)	$\mu\text{L}'de 2 \times 10^5$
Tüp 2	$\mu\text{L}'de 2 \times 10^4$
Tüp 3	$\mu\text{L}'de 2 \times 10^3$
Tüp 4	$\mu\text{L}'de 2 \times 10^2$
Tüp 5	$\mu\text{L}'de 20$
Tüp 6	$\mu\text{L}'de 2$

DNA Amplifikasyon Protokolü

DNA amplifikasyonu LightCycler® 480 II (Roche, Rotkreuz, İsviçre) cihazı kullanılarak yapıldı.

Önce 37°C'de 15 dakika, sonrasında 95°C'de 10 dakika denaturasyon uygulandı. Amplifikasyon 95°C'de 10 saniye, 60°C'de 1 dakika boyunca uygulandı. Bu iki döngü 50 siklus boyunca tekrarlandı. Sonrasında 30 saniye boyunca 40°C'de soğutma uygulanarak analiz yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi Uludağ Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda 'SPSS for Windows Version 20,0' istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Çalışmada sürekli değer alan değişkenler ortanca ve maksimum-minimum değerleriyle birlikte verildi. Kategorik değer alan değişkenler (cinsiyet) çapraz tablolarla verilip iki grup arasındaki farklılıkları saptamak için Pearson ki-kare testi kullanıldı. Sürekli değer alan yaş değişkeni için, normal dağılım göstermemesi nedeniyle, Kruskal-Wallis testi ve ikili grupların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Çalışmada anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Bu çalışmaya toplam 40 MF hastası (19 erkek, 21 kadın), 10 Kaposi sarkomu hastası (7 erkek, 3 kadın), 10 psoriasis hastası (5 erkek, 5 kadın), 10 atopik dermatit hastası (7 erkek, 3 kadın) dahil edildi. Pozitif ve negatif kontrol grupları ile hasta grubu yaşları bakımından birbirlerine denk değillerdi ($p<0.001$). MF hastalarının yaş ortancası 58, Kaposi sarkomu hastalarının yaş ortancası 72 ve psoriasis ve atopik dermatit hastalarının yaş ortancası 37 bulundu. Bunun nedeni Kaposi sarkomu ve mikozis fungoidesin genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkarken, atopik dermatit ve psoriasisin genellikle genç ve orta yaşlı popülasyonda görülmesiydi. Grupların yaş bakımından Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırılması Tablo-7'de sunulmuştur. Üç grup arasında cinsiyet açısından anlamlı farklılık bulunmamaktaydı ($p=0.368$). Çalışmaya alınan MF hastalarının demografik özellikleri, hastalık süreleri ve MF evreleri EK-1'de sunulmuştur. Çalışmaya dahil edilen tüm MF hastalarında hastalık süresi ortancası 5,5 yıldır (minimum 1, maksimum 35 yıl).

Tablo-7: Pozitif ve negatif kontrol grupları ve hastalık grubunun yaşlarının karşılaştırılması.

	KS	Pso+AD	MF	p	İkili karşılaştırılması (p değeri)	grupların (p değeri)
Yaş	72	37	58	<0.001	KS-pso+AD <0.001	
[Ortanca	90)	79)	(31-		KS-MF <0.001	
(min-			81)		MF-pso+A =0.001	
maks)]						

KS: Kaposi sarkomu, Pso: Psoriasis, AD: Atopik dermatit, MF: Mikozis fungoides

MF hasta grubunda 11 hasta evre 1a, 29 hasta ise evre 1b hastalığa sahipti. Hastalardan alınan deri biyopsilerinin 5 tanesi plak lezyonlardan, 1

tanesi poikilodermik yamalardan ve geri kalan 34 tanesi ise klasik MF yama lezyonlarından alınmıştı.

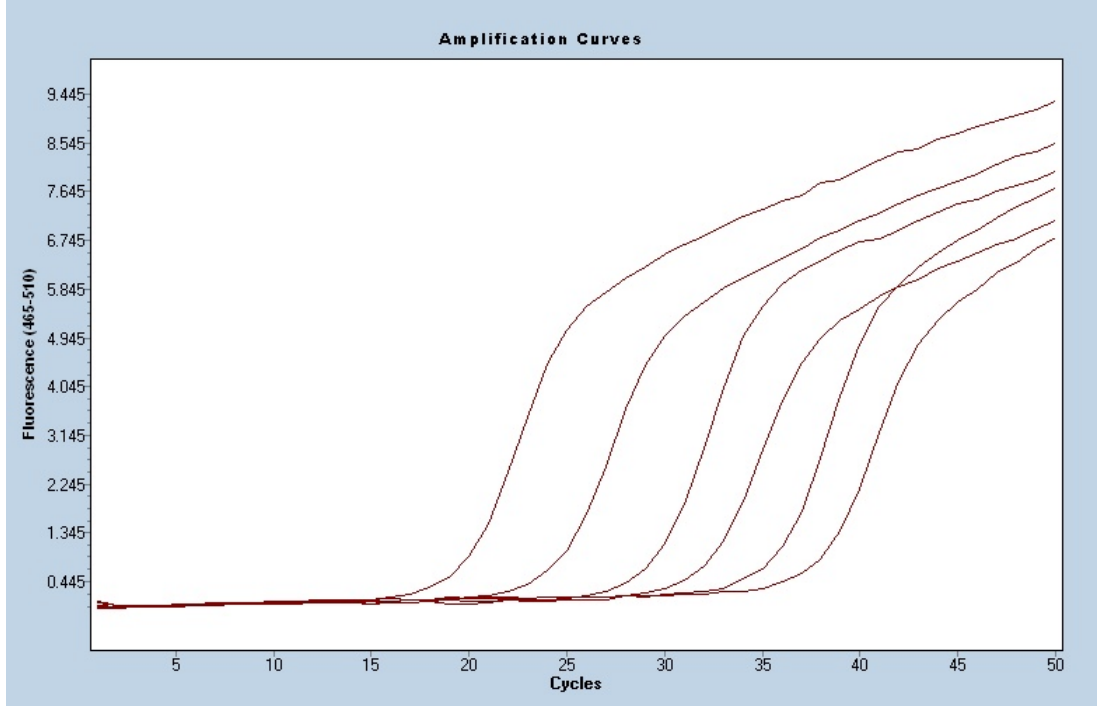
Çalışma grubu olarak 40 MF hastasının, pozitif kontrol grubu olarak 10 Kaposi sarkomu hastasının ve negatif kontrol grubu olarak da 10 psoriasis ve 10 atopik dermatit hastasının deri biyopsileri HHV-8 varlığı açısından analiz edildi.

Kaposi sarkomu hastalarının %100'ünün deri biyopsilerinde RT-PCR ile HHV-8 DNA'sına rastlandı. Bu hastalardaki DNA kopya sayıları kullanılan pozitif standart şablonlar ile oranlanarak Tablo-8'de sunulmuştur.

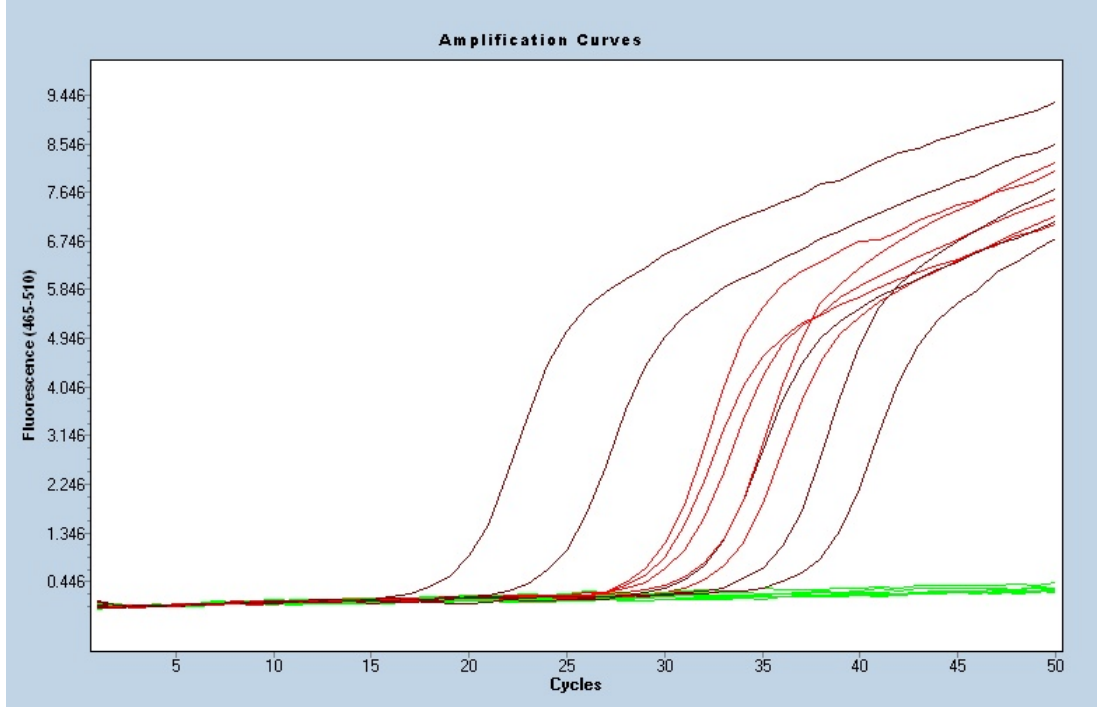
Tablo-8: Pozitif kontrol grubundaki hastaların deri biyopsilerinde saptanan DNA kopya sayısı.

Hasta numarası	DNA kopya sayısı (µL 'de)
1	5
2	45
3	7
4	6386
5	20
6	4252
7	1251
8	977
9	4353
10	167

MF hastalarından ve negatif kontrol grubundan ise hiçbir hastanın parafine gömülü deri biyopsisi örneklerinde HHV-8 DNA'sı saptanmadı. Pozitif standart şablonların ve bunlar ile karşılaştırmalı olarak hasta grubu (MF) ve negatif kontrol grubunun (psoriasis, atopik dermatit) PCR ile amplifikasyon eğrileri Şekil-6 ve Şekil-7'de gösterilmiştir.



Şekil-6: Pozitif standart şablonların amplifikasyon eğrileri. Real-time PCR ile öncelikle 15.-20. sikluslar arasında 200000 kopya/ μ L, 20. siklustan sonra 20000 kopya/ μ L, 25. siklustan sonra 2000 kopya/ μ L, 30. siklusta 200 kopya/ μ L, 30.-35. sikluslar arasında 20 kopya/ μ L ve 35.-40. sikluslar arasında 2 kopya/ μ L konsantrasyonlu standart şablonların floresanlarında artış gözleniyor.



Şekil-7: Standart şablonlar ile karşılaştırmalı olarak pozitif ve negatif kontrol grubunun ve hasta grubunun amplifikasyon eğrileri. Bordo renk ile gösterilen eğriler standart şablonlara (6 adet), kırmızı renk ile gösterilen amplifikasyon eğrileri PCR ile HHV-8 DNA'sının pozitif saptandığı 4 adet Kaposi sarkomu hastasına (4, 6, 9, 10 numaralı hastalar) ve yeşil renk ile gösterilen amplifikasyon eğrileri PCR ile HHV-8 DNA'sının negatif saptandığı negatif kontrol grubu ve MF hastalarına (25 ve 39 numaralı hastalar) aittir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

HHV-8 ilk defa 1994'te Kaposi sarkomlu (KS) hastalardan izole edilen bir gamaherpesvirüstür (24). HHV-8'in 140 kilobazlık genomu 4 büyük alt tipe ayrılabilir (A-D), ve bunlar da 14 farklı tipe değişim göstermişlerdir. HHV-8 sinyal iletiminde, hücre döngüsü düzenlenmesinde, apoptozisin inhibisyonunda ve immün modülasyonda kullanılan hücresel proteinleri kodlayan en az 11 ORF (open reading frame) taşımaktadır (25). Bu yüzden HHV-8 bir onkojenik virüsün genetik yapılarını içerir. HHV-8'in cinsel bulaşı kanıtlanmış olmakla birlikte endemik bölgelerde cinsel olmayan horizontal yolla geçişi de bildirilmiştir (26). HHV-8 seroprevalansı bazı Afrika ülkelerinde %100 iken, Akdeniz bölgesinde %15-20'yi bulmakta, kuzey Avrupa ve Amerika'da yaklaşık %2-%5 oranlarına düşmektedir (27). Bunun yanında KS, primer efüzyon lenfoması ve Multisentrik Castelman Hastalığı'nda ve daha birçok hastalıkta HHV-8 ilişkisi bildirilmiş; fakat sonraki çalışmalar anjiosarkom ve pemfigus vulgaris gibi hastalıklarda HHV-8 varlığını desteklememiştir (28-31).

Yirmibir çalışmayı içeren bir derlemede Kaposi sarkomlu hastaların lezyonlu bölgelerinden alınan deri biyopsilerinin polimeraz zincir reaksiyonunda hastaların %95'inde HHV-8 DNA'sı pozitif bulunmuştur (32). Bizim çalışmamızda ise tüm Kaposi sarkomu hastalarının (%100) lezyonlu deri örneklerinden HHV-8 DNA'sı izole edilmiştir. Negatif kontrol grubu olarak kullanılan psoriasis ve atopik dermatit hastalarının hiçbirinin deri biyopsilerinde ise HHV-8 DNA'sına rastlanmamıştır. Bu durum var olan literatürü desteklemektedir. Lenfoma benzeri germinotropik hastalıklarda (33) ve T hücre fenotipine sahip primer efüzyon lenfomasında (34) HHV-8'in saptanması kutanöz T hücreli lenfomada da bu virüsün rolü olabileceğini düşündürmüştür. 1997 yılında Henghold ve ark.ları (21), yine aynı yıl içerisinde Dupin ve ark.ları (22), 2000 yılında Nagore ve ark.ları (18) ve 2002 yılında Erkek ve ark.larının (35) yaptığı çalışmalar bu ilişkiyi desteklememiştir. Bunun aksine, Trento ve arkadaşları (19) MF hastalarının

%25'inin ve MF hastalığının öncülü olarak kabul edilen geniş plak parapsoriasis (GPP) hastalarının %100'ünün deri biyopsileri ve periferik kanında HHV-8 enfeksiyonunun varlığını rapor etmişlerdir. Sonrasında Kreuter ve ark.'nın (20) yaptığı çalışmada GPP hastalarının %87'sinin ve MF hastalarının %70'inin deri biyopsilerinde *nested* PCR yöntemi ile HHV-8 DNA'sına rastlanmıştır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise bizim çalışmamızda kullanılan *real-time* (RT)-PCR cihazı kullanılmış ve 27 MF hastasının sadece ikisinde HHV-8 DNA'sı saptanmıştır (36). Bizim çalışmamızda ise örneklerin hiçbirinde HHV-8 DNA'sına rastlanmamıştır. Bu konu hakkında daha önce yapılan çalışmaların sonuçları Tablo-9'da özetlenmiştir.

MF'li hastaların doku örneklerinde HHV-8 saptayamayan tüm çalışmalarda hastalar daha önce herhangi bir tedavi almamışlardı. Bizim çalışmamızda ise hastaların bir kısmı tedavi almamışken, bir kısmı ise daha önce topikal ya da sistemik immunsupresif ilaçlarla tedavi edilmişlerdi. Pozitif sonuçlar bulunan bir çalışmada yüksek HHV-8 prevalansı yoğun tedavi altındaki hastalarda yeni hastalık ya da HHV-8 reaktivasyonu ile ya da hastalığın ileri aşamasındaki immun baskılanma ile açıklanmıştı (20). Buna rağmen, bizim çalışmamızda immunsupresif tedavi alan hastaların deri örneklerinde HHV-8 DNA'sı saptanmamıştır.

Daha önceki çalışmalar incelendiğinde, mikozis fungoideste HHV-8'in rolüne ilişkin kafa karıştırıcı sonuçlar birkaç farklı hipotez ile açıklanabilir. Bunlardan birincisi kullanılan teknik ile ilişkili olup, parafine gömülü örneklerden kesit alma, deparafinizasyon, DNA ekstraksiyonu ya da PCR işlemi sırasında kontaminasyon ortaya çıkabilmesidir. Bizim çalışmamızda bu basamakların hepsi titizlikle gerçekleştirilmiş olup ultraviyole ile sterilize edilen ve PCR içermeyen alanlarda pipetleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun yanı sıra deri biyopsisi sırasında hastanın periferik kan mononükleer hücrelerindeki viral dizilimler deri örneğini kontamine etmiş olabilir. Son olarak da Trento (19) ve Kreuter'ın (20) çalışmalarında kullandıkları *nested* PCR yöntemi PCR kontaminasyonu riskini her zaman dışlamamaktadır. Buna rağmen, *real time* PCR yöntemi, özellikle immun sistemi baskılanmış

hastalarda, herpes virüs reaktivasyonunu belirlemede virüs genomunun yüksek duyarlılık ve güvenilirlikle tanınmasına olanak sağlar (37,38).

Tablo-9: Mikozis fungoidesli hastaların deri biyopsilerinde PCR ile HHV-8 varlığını araştıran diğer çalışmaların özeti.

Literatür (yıl)	Hasta sayısı	Yöntem	Bulgular
Henghold ve ark.'ları (1997) (21)	16 MF 7 LyP 7 PKBHL 5 HL	PCR	Tüm gruplar negatif
Dupin ve ark.'ları (1997) (22)	23 MF 5 SS 2 PTHL 2 ABTHL 1 HTLV1 ilişkili THL 8 B-hücreli lenfoma 6 GPP		1 GPP hastasında pozitif sonuç
Nagore ve ark.'ları (2000) (18)	29 MF 3 MF ile birlikte folliküler musinöz 3 PKBHL 2 PTHL 1 anjiosentrik KTHL 9 FMKBHL 4 marjinal zon KBHL	PCR	Tüm gruplar negatif
Erkek ve ark.'ları (2002) (35)	50 MF	PCR	Tüm hastalar negatif
Trento ve ark.'ları (2005) (19)	12 MF 10 GPP	Nested PCR	1 MF ve 10 GPP hastasında pozitif sonuçlar
Kreuter ve ark.'ları (2008) (20)	8 GPP 10 MF 4 LyP	Nested PCR	7 GPP ve 7 MF hastasında pozitif sonuçlar, tüm LyP hastalarında negatif sonuçlar
Fahad (2010) (36)	27 MF	Real-time PCR	2 hastada pozitif sonuçlar

MF: Mikozis fungoides, LyP: lenfomatoid papülozis, ABTHL: Anaplastik büyük T-hücreli lenfoma, THL: T-hücreli lenfoma, PKBHL: Primer kutanöz CD30⁺ Büyük hücreli lenfoma, PTHL: Pleomorfik T hücreli lenfoma, KTHL: Kutanöz T hücreli lenfoma, FMKBHL: Follikül merkez kutanöz B hücreli lenfoma, GPP: geniş plak parapsoriasis

Sonuç olarak bu çalışmada, mikozis fungoides hastalarının deri biyopsisi örneklerinde HHV-8'in saptanmaması, bu hastalığın etyolojisinde HHV-8'in rolü olmadığını düşündürmüştür. Pozitif sonuçlar bulan çalışmalarda kontaminasyon ihtimalinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Wiellemze R. Cutaneous T Cell Lymphoma. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP (eds). *Dermatology*. 2nd edition. St. Louis: Mosby/Elsevier; 2008. 1867-86.
2. Girardi M, Heald PW, Wilson LD. The pathogenesis of mycosis fungoides. *N Engl J Med* 2004;350(19):1978-88.
3. Yamashita T, Abbade LP, Marques ME, Marques SA. Mycosis fungoides and Sézary syndrome: clinical, histopathological and immunohistochemical review and update. *An Bras Dermatol* 2012;87(6):817-28.
4. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005;105(10):3768-85.
5. Wong HK, Mishra A, Hake T, Porcu P. Evolving Insights in the Pathogenesis and Therapy of Cutaneous T-cell lymphoma (Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome). *Br J Haematol* 2011;155(2):150-66
6. Keehn CA, Belongie IP, Shistik G, Fenske NA, Glass LF. The diagnosis, staging, and treatment options for mycosis fungoides. *Cancer Control* 2007;14(2):102-11.
7. Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, et al. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood* 2007;110(6):1713-22.
8. Kim EJ, Hess S, Richardson SK, et al. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest* 2005;115(4):798-812.
9. Carbone A, Bernardini L, Valenzano F, et al. Array-based comparative genomic hybridization in early-stage mycosis fungoides: recurrent deletion of tumor suppressor genes BCL7A, SMAC/DIABLO, and RHOA. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47(12):1067-75.
10. Karenko L, Hahtola S, Ranki A. Molecular cytogenetics in the study of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL). *Cytogenet Genome Res* 2007;118(2-4):353-61.
11. Hoppe RT, Medeiros LJ, Warnke RA, et al. CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes influence the long-term survival of patients with mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 1995;32:448-53.
12. Vermeer MH, van Doorn R, Dukers D et al. CD8+ T cells in cutaneous T-cell lymphoma: expression of cytotoxic proteins, Fas Ligand, and killing inhibitory receptors and their relationship with clinical behavior. *J Clin Oncol* 2001;19(23):4322-9.
13. Weinstock MA. Epidemiology of mycosis fungoides. *Semin Dermatol* 1994;13:154-9.

14. Erkek E, Sahin S, Atakan N, et al. Examination of MF for the presence of EBV and HHV-6 by PCR. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001;15(5):422-6.
15. Novelli M, Merlino C, Ponti R, et al. Epstein-Barr virus in cutaneous T-cell lymphomas: evaluation of the viral presence and significance in skin and peripheral blood. *Arch Dermatol Res* 2009;301(9):647-52.
16. Mirvish ED, Pomerantz RG, Geskin LJ. Infectious agents in cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol* 2011;64(2):423-31.
17. Geraminejad P, Memar O, Aronson I, et al. Kaposi's sarcoma and other manifestations of human herpesvirus 8. *J Am Acad Dermatol* 2002;47(5):641-55.
18. Nagore E, Ledesma E, Collado C, et al. Detection of Epstein-Barr virus and human herpesvirus 7 and 8 genomes in primary cutaneous T- and B-cell lymphomas. *Br J Dermatol* 2000;143:320-3.
19. Trento E, Castilletti C, Ferraro C, et al. Human herpesvirus 8 infection in patients with cutaneous lymphoproliferative diseases. *Arch Dermatol* 2005;141(10):1235-42.
20. Kreuter A, Bischoff S, Skrygan M, et al. High Association of Human Herpesvirus 8 in Large-Plaque Parapsoriasis and Mycosis Fungoides. *Arch Dermatol* 2005;144(8):1011-6.
21. Henghold WB II, Purvis SF, Schaffer J, et al. No evidence of KSHV/HHV-8 in mycosis fungoides or associated disorders. *J Invest Dermatol* 1997;108(6):920-2.
22. Dupin N, Franck N, Calvez V, et al. Lack of evidence of human herpesvirus 8 DNA sequences in HIV-negative patients with various lymphoproliferative disorders of the skin. *Br J Dermatol* 1997;136:827-30.
23. Templeton NS. The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. *Diagn Mol Pathol* 1992;1:58-72.
24. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994;266(5192):1865-9.
25. Lazzi S, Bellan C, Amato T, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 infection in reactive lymphoid tissues: a model for KSHV/HHV-8-related lymphomas? *Hum Pathol* 2006;37(1):23-31.
26. Martin JN, Ganem DE, Osmond DH, et al. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *N Engl J Med* 1998;338(14):948-54.
27. Chatlynne LG, Ablashi DV. Seroepidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV). *Semin Cancer Biol* 1999;9(3):175-85.
28. Gyulai R, Kemeny L, Kiss M, et al. Human herpesvirus 8 DNA sequences in angiosarcoma of the face. *Br J Dermatol* 1997;137(3):467.
29. Fink-Puches R, Zochling N, Wolf P, Back B, Kerl H, Soyer HP. No detection of human herpesvirus 8 in different types of cutaneous angiosarcoma. *Arch Dermatol* 2002;138(1):131-2.

30. Memar OM, Rady PL, Goldblum RM, Yen A, Tyring SK. Human herpesvirus 8 DNA sequences in blistering skin from patients with pemphigus. *Arch Dermatol* 1997;133(10):1247-51.
31. Cohen SS, Weinstein MD, Herndier BG, Anhalt GJ, Blauvelt A. No evidence of human herpesvirus 8 infection in patients with paraneoplastic pemphigus, pemphigus vulgaris, or pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol* 1998;111(5):781-3.
32. Olsen SJ, Moore PS. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) and the etiology of KS. In: Medveczky P, Friedman H, Bendinelli M (eds). *Herpesviruses and immunity*. New York: Plenum Publishing; 1998. 115-40.
33. Du MQ, Diss TC, Liu H, et al. KSHV- and EBV-associated germinotropic lymphoproliferative disorder. *Blood* 2002;100(9):3415-8.
34. Said JW, Shintaku IP, Asou H, et al. Herpesvirus 8 inclusions in primary effusion lymphoma: report of a unique case with T-cell phenotype. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123(3):257-60.
35. Erkek E, Senturk N, Dincer I, et al. Identification of herpes simplex virus DNA and lack of human herpesvirus-8 DNA in mycosis fungoides. *Acta Derm Venereol* 2002;82(3):214-6.
36. Fahad AS. Prevalence of Human Herpes Virus-8 (HHV-8) in untreated patients with early stage Mycosis Fungoides (A retrospective study). *Int J Health Sci (Qassim)* 2010;4(2):128-38.
37. Oksenhendler E, Carcelain G, Aoki Y, et al. High levels of human herpesvirus 8 viral load, human interleukin-6, interleukin-10, and C reactive protein correlate with exacerbation of multicentric castlemann disease in HIV-infected patients. *Blood* 2000;96:2069-73.
38. Boutolleau D, Fernandez C, Andre E, et al. Human herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7: two closely related viruses with different infection profiles in stem cell transplantation recipients. *J Infect Dis* 2003;187:179-86.

EKLER

EK-1: Çalışmadaki mikozis fungoides hastalarının klinik ve demografik özellikleri.

Yaş	Cinsiyet	Hastalık süresi (yıl)	MF evresi
66	E	35	T2N0M0
74	E	7	T2N0M0
65	K	3	T2N0M0
70	E	9	T1N0M0
66	K	10	T1N0M0
55	E	3	T1N1M0
42	K	20	T2N0M0
81	E	15	T2N0M0
33	E	1	T2N0M0
47	K	22	T2N0M0
31	K	2	T1N0M0
32	E	2	T2N0M0
59	E	3	T2N0M0
69	E	5	T2N0M0
77	K	4	T1N0M0
58	K	11	T2N0M0
35	K	5	T2N0M0
64	E	1	T1N0M0
59	E	1	T1N0M0
63	K	1	T2N0M0
32	E	1	T2N0M0
46	K	1	T2N0M0
57	K	14	T1N0M0
41	K	7	T1N0M0
41	E	9	T2N0M0
48	K	30	T1N0M0
66	E	7	T2N0M0
36	E	2	T2N0M0
69	K	4	T2N0M0
45	E	6	T2N0M0
42	K	1	T2N0M0
69	K	2	T2N0M0
62	K	12	T2N0M0
52	K	9	T2N0M0
71	K	2	T2N0M0
58	E	30	T2N0M0
73	E	11	T2N0M0
54	K	20	T2N0M0
44	K	23	T1N0M0
70	E	1	T2N0M0

MF: Mikozis fungoides

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca emeği olan; daima yakın desteğini gördüğüm sayın hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Kenan Aydoğan'a; bilgi ve tecrübelerinden daima faydalandığım sayın hocam, Anabilim Dalı Başkanımız, Prof. Dr. Emel Bülbül Başkan'a; mesleki eğitimimde büyük katkıları bulunan ve eğitimim boyunca bana her zaman destek olan sayın hocam Prof. Dr. Şükran Tunalı'ya; çalışmalarımnda ve eğitimimde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, uzmanlık eğitimim boyunca kendisinden çok şey öğrendiğim sayın hocam Prof. Dr. Hayriye Sarıcaoğlu'na; birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve tüm Deri ve Zührevi Hastalıkları Anabilim Dalı çalışanlarına; tezimin laboratuvar aşamasında ilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen Uludağ Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Harun Ağca'ya, laboratuvar teknisyeni Saniye Bahar'a; yaşamım boyunca bana güç veren, hoşgörü ile beni kucaklayan, tüm varlıklarıyla benimle olan sevgili anneme, babama ve kardeşime, hayatıma anlam katan sevgili eşime ve biricik oğluma

Teşekkür ederim.

Dr. Sema İpek ALGAN

ÖZGEÇMİŞ

26.10.1984'te İstanbul'da doğdum. İlkokul öğrenimimi Eczacıbaşı İlköğretim Okulu'nda; ortaokul ve lise öğrenimimi İstanbul Köy Hizmetleri Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2002 yılında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde eğitim görmeye hak kazandım. Haziran 2008'de Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. Eylül 2008-Ocak 2009 tarihleri arasında devlet hizmeti yükümlülüğüm gereği Kangal Çetinkaya Sağlık Ocağı'nda pratisyen hekim olarak çalıştım. 26.01.2009'da Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıkları Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım. Halen aynı bölümde uzmanlık eğitimime devam etmekteyim.