

Hodgkin Hastalığında Prolifere Hücre Nükleer Antijeni (PCNA) ve Ki-67 ile Değişik Hücresel Kompartmanlarda Proliferasyon İndeksi Kıyaslaması

Dr. Mine Hekimgil¹, Dr. Aydın İşisag², Dr. Ali Veral¹, Dr. Semin Ayhan¹, Dr. Saliha Soydan¹

ÖZET

Çalışmada, PCNA (PC10) ve Ki-67 antikorlarının, Hodgkin hastalığının (HH) değişik histopatolojik alttiplerinde Reed-Sternberg hücreleri ve varyantları, Hodgkin hücreleri ve zemindeki lenfositlerde dağılımını belirlemek amacıyla streptavidin-biotin peroksidaz metodu ile 35 olguda immünohistokimyasal inceleme yapılmıştır. Tüm HH olgularında, Reed-Sternberg hücrelerinin ortalama PCNA indeksi %88±9.6, Ki-67 indeksi %61.1±15.8'dir. Mononükleer Hodgkin hücreleri açısından bakıldığında da, PCNA indeksi %80.1±12.5, Ki-67 indeksi %54.0±16.0 olup, benzer şekilde PCNA antikoruna ile daha yüksek bir reaksiyon dikkati çekmiştir. Her iki antikor ile Reed-Sternberg hücrelerinin Hodgkin hücrelerine kıyasla daha yüksek proliferasyon indeksleri verdikleri saptanmıştır. Zemindeki lenfositler infiltrasyonun PCNA indeksi ortalama %12.3±12.9 iken, Ki-67 indeksi %5.9±5.3 olup, belirgin olarak düşük bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler : Hodgkin hastalığı, PCNA, Ki-67

ÖZET

Proliferasyon indeksinin belirlenmesi, bazı malignitelerde klinik gidişin önemli bir göstergesi olarak açığa çıkmış ve uygun tedavi protokollerinin seçiminde gözönünde bulundurulacak faktörler arasına girmiştir. Son olarak PCNA ve Ki-67'ye karşı geliştirilen proliferasyonla ilişkili antikorlar parafin doku kesitlerinde değişik tümörlerin proliferasyon hızının belirlenmesine yardımcı olmaktadır. Non-Hodgkin lenfomalarında (NHL) tümör hücrelerinde proliferasyon hızını belirlemeye yönelik çalışmalar, hücre diferansiasyonu ve morfolojik

THE EVALUATION OF PCNA AND KI 67 IN HODGKIN'S DISEASE

An immunohistochemical study using streptavidin biotin peroxidase method was applied to 35 cases of Hodgkin's disease (HD), to define the distribution of PCNA (PC10) and Ki-67 antibodies within Reed-Sternberg cells and variants, Hodgkin cells and background lymphocytes of various histopathologic subtypes of HD. The average PCNA and Ki-67 indices of all cases were %88.0±9.6 and %61.1±15.8 within Reed-Sternberg cells and %80.1±12.5 and %54.0±16.0 within mononuclear Hodgkin cells, respectively. A higher reactivity rate was observed with the PCNA antibody. Reed-Sternberg cells exhibited a higher proliferation index in comparison to Hodgkin cells with both antibodies. The average PCNA index of background lymphocytes was %12.3±12.9 and the Ki-67 index was %5.9±5.3, much lower than the PCNA index.

Key Words : Hodgkin's disease, PCNA, Ki-67.

sınıflandırma ile korelasyon gösteren sonuçlar vermiş ve prognostik bilgiler sağlamışlardır^(1,2,3). Ancak Hodgkin hastalığında (HH) hücrelerin heterojenitesi nedeniyle biyolojik özelliklerin belirlenmesi güç olmuş ve araştırmacıların çoğu için henüz netlik kazanmayan bir konu olarak kalmıştır^(4,5,6).

Çalışmada, PCNA ve Ki-67 antikorlarının, HH'nin değişik histolojik alttiplerinde Reed-Sternberg hücreleri ve varyantları, Hodgkin hücreleri ve zemin lenfosit popülasyonundaki dağılımını belirlemek ve alttipler arasında kıyaslama yanı sıra, her iki antikor sonuçlarının korelasyonunu araştırmak amacıyla 35 HH olgusunda immünohistokimyasal inceleme yapılmıştır.

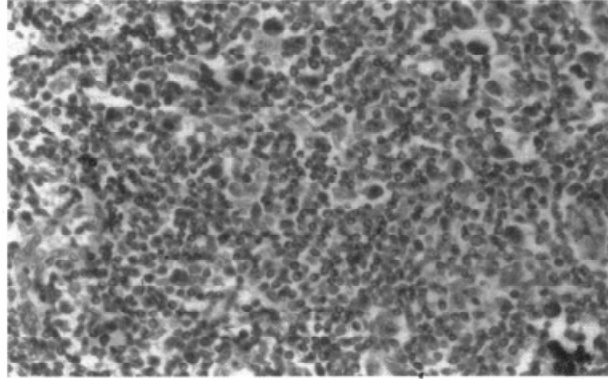
GEREÇ VE YÖNTEM

EÜTF Patoloji Anabilim Dalının son bir yıllık arşivinden

¹ Patoloji Anabilim Dalı, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Bornova, İzmir
² Patoloji Anabilim Dalı, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Manisa

alınan toplam 35 HH olgusuna ait hematoksil-eosin boyalı preparatlar değerlendirilmiş ve Rye konferansında düzenlenen Lukes ve Butler sınıflandırmasına (7) göre tekrar gözden geçirilmiştir. B5-formalin tesbiti, parafine gömülü doku örneklerinden polilizin kaplı preparatlara (Menzel-Glaser, Almanya) 5 mikron kalınlıkta kesitler alınarak PCNA (PC10) antijeni ve Ki-67 antijenine karşı geliştirilmiş antikorlar ile bir seri negatif kontrol eşliğinde immünohistokimyasal boyama yapılmıştır.

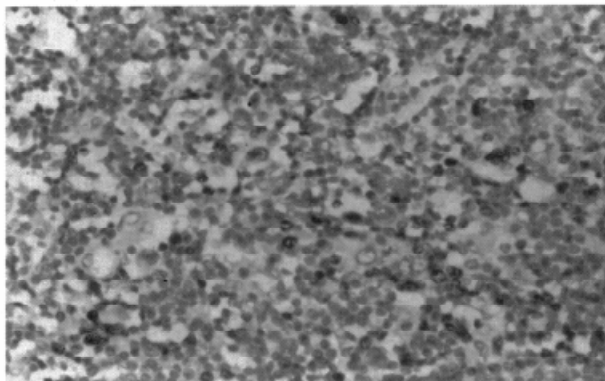
İmmünohistokimyasal boyama öncesinde, PCNA uygulanacak kesitler etüv takibine alınmamış, diğerleri bir gece 60°C ılık etüvde tutulmuştur. Kesitlerin, rutin deparafinizasyon ve rehidratasyonu ardından, endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük H_2O_2 'de 5 dakikalık inkübasyon ile bloke edilmiştir. Daha sonra kesitler 0.01M sodyum sitrat tamponu (6.0 pH) içinde ikişer 5 dakikalık siklus halinde mikrodalga takibine alınmıştır. Sikluslar arasında buharlaşan tampon solüsyon eklenerek kesitlerin kurumasının engellenmesine özen gösterilmiştir. Distile su ile yıkanan kesitler predilüe PCNA antikor (Dako, Danimarka) ve 1:100 oranında dilüe edilen Ki-67 antikor (Dako, Danimarka) ile 30 dakika inkübe edilmiştir. Negatif kontrol kesitler ise bu basamak sırasında TRIS tampon solüsyonu (TBS) ile inkübe edilmiştir. Daha sonraki immünperoksidaz boyama, streptavidin-biotin peroxidaz metoduna uygun hazır kit (LSAB2 kit, Dako, Danimarka) ile yapılmıştır. Tüm basamaklar arasında kesitler TBS ile oda ısısında 5 dakika yıkanmıştır. Kromojen madde olarak diaminobenzidin- H_2O_2 (DAB, Dako, Danimarka) kullanılmış, hematoksilin ile zıt boyama ardından ksilol ve alkol ile dehidratasyon basamakları uygulanmış ve kesitler rutin kapatma vasatı ile kapatılmıştır. Tüm olgularda PCNA ve Ki-67 antikorlarıyla boyanan hücrelerin oranı, ortalama on ayrı mikroskopik alanda x1000'lik büyütmede 1000 hücre sayarak saptanmıştır. Değerlendirmeler iki ayrı araştırmacı (M.H., A.İ.) tarafından bağımsız olarak yapılmıştır. Tümörün subtipi için tipik olan alanlar seçilmesine özen gösterilmiştir. Her iki antikor için de her türlü diffüz ya da granüler nükleer boyanma pozitif olarak kabul edilmiştir. Kuşkulu nükleer boyanma gösteren hücreler sayıma dahil edilmemiştir. Her olguda Reed-Sternberg hücreleri, mononükleer Hodgkin hücreleri ve zemindeki lenfoid hücre popülasyonu için pozitif ve negatif nükleuslar ayrı değerlendirmeye alınmıştır. Olgu grupları arasında PCNA ve Ki-67 indeksindeki farklılıkların istatistiksel anlamlılığının saptanması için t testi uygulanmıştır.



Resim 1 : Nodüler sklerozan tip Hodgkin hastalığında PCNA antikor (Dako) ile Reed-Sternberg ve Hodgkin hücreleri ile bir kısım zemin lenfositte nükleer ve nükleoler boyanma örneği (streptavidin-biotin peroxidazx400)

BULGULAR

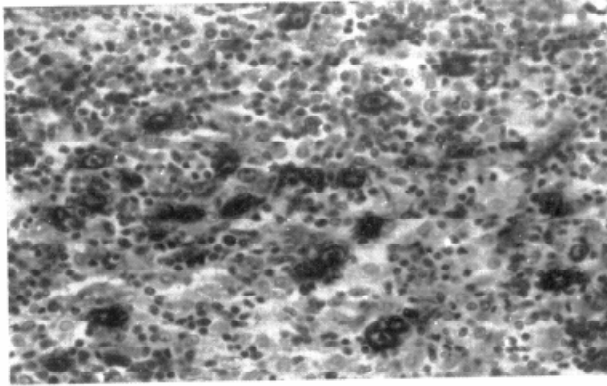
Çalışmaya dahil edilen 35 HH olgusu histopatolojik alttipleri açısından gruplandırıldığında, beşi diffüz lenfositten zengin tip, ikisi nodüler lenfositten zengin tip, 11'i mikst sellüler, 13'ü nodüler sklerozan ve dördü lenfositten fakir tiptir. Olguların tümünde neoplastik Reed-Sternberg ve Hodgkin hücreleri ile küçük lenfositlerde PCNA ve Ki-67 antikorları ile yalnızca büyük büyütmede saptanan zayıf bir boyanmadan, küçük büyütmede hücreleri belirginleştiren yoğun boyanmalara kadar değişen derecelerde nükleer pozitiflik alınmıştır (Resim 1 ve 2). Olguların %94'ünde PCNA antikor (Dako) ile Reed-Sternberg ve Hodgkin hücrelerinin nükleoluslarında kuvvetli boyanma görülmüştür. Yirmisekiz olguda (%80) ise PCNA antikor (Dako) ile Reed-Sternberg hücrelerinde nükleus yanısıra sitoplazmada farklı yoğunluklarda



Resim 2 : Ki-67 antikor (Dako) ile mikst sellüler tip Hodgkin hastalığında nükleer boyanma örneği (streptavidin-biotin peroxidazx400)

pozitif reaksiyon tesbit edilmiştir (Resim 3). Boyanan hücre oranlarını değerlendirmede gözlemcilerin saptadıkları değerlerin ortalaması alınmış ve gözlemciler arası fark %5'den az bulunmuştur.

Her iki proliferasyon belirleyicisinin HH'nın histopatolojik alttıplerindeki ortalama değerleri Tablo 1'de, en yüksek ve en düşük değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Tüm HH olgularında Reed-Sternberg hücrelerinin ortalama PCNA indeksi 88.0 ± 9.6 , Ki-67 indeksi 61.1 ± 15.8 olup, PCNA antikoru ile Ki-67'ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yükseklik



Resim 3 : Mikst sellüler tip Hodgkin hastalığında Reed-Sternberg hücrelerinde nükleus yanı sıra sitoplazmik pozitiflik (streptavidin-biotin peroxidazx400).

		LZT, diffüz	LZT, nodüler	MST	NST	LFT	ORTALAMA
PCNA:	Reed-Sternberg	86.30±7.27	97.00±2.12	83.23±6.47	86.73±12.19	93.25±5.68	87.99±9.63
	hücreleri	(3.25)	(1.50)	(1.79)	(3.68)	(2.84)	(1.63)
	ortalama %	86.30±9.57	86.50±4.24	75.81±7.46	78.73±18.11	83.25±6.06	80.14±12.47
	(standart hata)	(4.28)	(3.00)	(2.07)	(5.46)	(3.43)	(2.11)
Ki-67:	Reed-Sternberg	68.00±19.58	63.50±5.66	57.23±13.01	60.46±20.04	64.63±10.87	61.11±15.84
	hücreleri	(8.75)	(4.00)	(3.61)	(6.04)	(5.44)	(2.68)
	ortalama %	61.00±18.46	57.00±6.36	50.50±14.32	54.00±20.15	54.75±9.99	54.04±15.99
	(standart hata)	(8.26)	(4.50)	(3.97)	(6.06)	(4.98)	(2.70)
TOPLAM N=	Reed-Sternberg	5	2	11	13	4	35
	hücreleri	(1.33)	(0.25)	(1.90)	(0.95)	(1.02)	(0.89)
	ortalama %	5.30±2.97	1.25±0.35	9.06±6.86	4.32±3.15	3.00±2.04	5.90±5.28
	(standart hata)	(1.33)	(0.25)	(1.90)	(0.95)	(1.02)	(0.89)

Tablo 1 : Histolojik tiplere kıyasla PCNA ve Ki-67 pozitif hücre oranları.

saptanmıştır ($p<0.001$). Mononükleer Hodgkin hücreleri açısından bakıldığında da, PCNA indeksi 80.1 ± 12.5 , Ki-67 indeksi 54.0 ± 16.0 olup, benzer şekilde PCNA antikoru ile daha yüksek bir reaksiyon dikkati çekmiştir ($p<0.001$). Ayrıca gerek PCNA, gerek Ki-67 antikoru ile Reed-Sternberg hücreleri ile Hodgkin hücrelerinin boyanma oranları kıyaslandığında, Reed-Sternberg hücrelerinin anlamlı ölçüde daha yüksek proliferasyon indeksleri verdikleri de saptanmıştır ($p<0.005$).

Histopatolojik alt tiplere göre sonuçlar kıyaslandığında, Reed-Sternberg ve Hodgkin hücreleri en yüksek PCNA pozitifliğini 97.0 ± 2.1 ve 89.5 ± 4.2 olarak lenfosit zengin, nodüler alttıpte göstermiştir. Bunu takiben diffüz lenfosit zengin tip, lenfosit fakir tip ve nodüler sklerozan tip gelmektedir. En düşük PCNA pozitifliği ise Reed-Sternberg ve Hodgkin hücrelerinde sırasıyla 83.2 ± 6.5 ve 75.8 ± 7.5 ile mikst sellüler tipte saptanmıştır. Mikst sellüler tip, özellikle lenfosit zengin nodüler ve diffüz alttıplere kıyasla Reed-Sternberg ve mononükleer Hodgkin hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük proliferasyon indeksi vermiştir ($p<0.01$). Ki-67 indeksi değerlendirildiğinde, Reed-Sternberg ve Hodgkin hücrelerinde en yüksek indeks 68.9 ± 19.6 ve 61.6 ± 18.5 değerleri ile lenfosit zengin, diffüz alttıpte saptanmış, bunu nodüler alttip ve lenfosit fakir tip, ardından nodüler sklerozan tip izlenmiş, mikst sellüler tip en düşük indeks vermiştir. Mikst sellüler tipte Ki-67 indeksi Reed-

		LZT, diffüz	LZT, nodüler	MST	NST	LFT	ORTALAMA
PCNA:	Reed-Sternberg	82.5-100.0	96.5-98.5	74.0-96.5	83.0-100.0	87.5-99.5	83.0-100.0
	hücreleri	(3.25)	(1.50)	(1.79)	(3.68)	(2.84)	(1.63)
	ortalama %	86.30±9.57	86.50±4.24	75.81±7.46	78.73±18.11	83.25±6.06	80.14±12.47
	(standart hata)	(4.28)	(3.00)	(2.07)	(5.46)	(3.43)	(2.11)
Ki-67:	Reed-Sternberg	41.0-96.5	59.5-67.5	39.0-79.5	38.5-95.5	51.0-77.0	39.0-96.5
	hücreleri	(8.75)	(4.00)	(3.61)	(6.04)	(5.44)	(2.68)
	ortalama %	61.00±18.46	57.00±6.36	50.50±14.32	54.00±20.15	54.75±9.99	54.04±15.99
	(standart hata)	(8.26)	(4.50)	(3.97)	(6.06)	(4.98)	(2.70)
TOPLAM N=	Reed-Sternberg	5	2	11	13	4	35
	hücreleri	(1.33)	(0.25)	(1.90)	(0.95)	(1.02)	(0.89)
	ortalama %	5.30±2.97	1.25±0.35	9.06±6.86	4.32±3.15	3.00±2.04	5.90±5.28
	(standart hata)	(1.33)	(0.25)	(1.90)	(0.95)	(1.02)	(0.89)

Tablo 2 : Histolojik tiplere kıyasla en yüksek ve en düşük PCNA ve Ki-67 pozitif hücre oranları.

Sternberg ve Hodgkin hücrelerinde sırasıyla %57.2±13.0 ve %50.5±14.3 dır. Ancak histolojik subtipler birbirleriyle kıyaslandığında, Ki-67 indeksi açısından istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklılık saptanmamıştır. Tablo II'deki en düşük ve en yüksek değerlere bakıldığında da olgularındaki indeksler arasında belirgin geçişler olduğu ve tipler arasında pozitif hücre oranları açısından kesin sınırlar çizilemeyeceği dikkati çekmektedir.

Zemindeki lenfositler infiltrasyonun PCNA indeksi ortalama %12.3±12.9 iken, Ki-67 indeksi %5.9±5.3 olup, PCNA indeksine kıyasla belirgin olarak düşük bulunmuştur (p=0.009). Lenfosit proliferasyonu PCNA ile %14.8±13.9 olarak en yoğun mikst sellüler tipte saptanmış, bunu lenfositten zengin, diffüz alttip, nodüler sklerozan tip, lenfositten fakir tip takip etmiştir. Lenfosit zengin, nodüler alttipin zemin lenfosit popülasyonunda %4.5±1.4 ile en düşük proliferasyon indeksini vermesi çarpıcı bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Ki-67 sonuçları kıyaslandığında ise mikst sellüler tipte indeks %9.1±6.9 ile en yüksek, lenfositten zengin, nodüler alttipinde ise %1.3±0.4 olarak benzer şekilde en düşük olarak saptanmış, aradaki histolojik alttipler PCNA indeksi sıralamasına benzer dağılım göstermişlerdir.

TARTIŞMA

İlk olarak Benjamin and Gown (4) HH'da Reed-Sternberg hücreleri ve varyantlarında aberran sitoplazmik PCNA pozitifliği tanımlayarak, bu reaksiyonun ayırıcı tanıda yardımcı bir immünohistokimyasal yöntem olabileceğini bildirmişlerdir. Bu açıdan çalışma grubundaki olgular irdelendiğinde, %80'inde Reed-Sternberg ve Hodgkin hücrelerinde nükleus yanı sıra sitoplazmik PCNA boyanması saptanmış, sitoplazmik boyanmanın Benjamin ve Gown'un (4) bildirdiği gibi olguların tümüne ait bir ortak özellik olamayacağı saptanmıştır. Ayrıca Kamel ve ark. (5) Society of Hematopathology'ye ait 42 çalışma grubu olgusunda PCNA'nın hem 19A2, hem de PC10 izotiplerini denemişler, 18 HH olgusundan 15'i (%83) 19A2 ve/veya PC10 ile pozitif reaksiyon vermiş ve bunların %80'i hem nükleer, hem de sitoplazmik boyanma göstermiştir. Çalışmamıza dahil edilen 35 HH olgusunun ise tümünde neoplastik Reed-Sternberg ve Hodgkin hücrelerine PCNA ile nükleer reaksiyon alınmış, %80'inde değişik oranlarda sitoplazmik pozitiflik tesbit edilmiştir. Bu bulguya ek olarak, Kamel ve ark.larının (5) çalışmaya aldığı büyük hücreli lenfoma ve Reed-Sternberg benzeri hücreler içeren kronik lenfositler lösemilerin de dahil olduğu 16 NHL olgusundan 12'sinde (%75) PCNA ile reaksiyon

alınmış, bunların %67 gibi çoğunluğunu kapsayan bir grup hem nükleer, hem de sitoplazmik reaksiyon vermiştir.

Schmid ve ark.larının (8) 52 olguluk serisinde de Benjamin and Gown'un (4) sonuçlarının aksine, PCNA pozitifliği hemen daima nükleusa sınırlı bulunmuş, nadiren sitoplazmada boyanma görülmüştür. Şabattini ve ark. (6) 25 HH ve 100 NHL olgusuna Ki-67 ve PCNA (PC10) uygulamış, benzer şekilde PCNA ile Reed-Sternberg ve Hodgkin hücrelerinde stabil bir sitoplazmik boyanma gözlemeyerek, bu uyumsuzluğun olgularının tümünün formalinde tesbitlenmiş olmasının bağlı olabileceğini vurgulamışlardır. Bizim çalışmamızdaki olguların tümü ise B5-formalin tesbitlidir ve boyanma sonuçlarındaki farklılık diğer yazarların da vurguladığı gibi tesbit solüsyonlarının farkına bağlı olabilir. Dolayısıyla sitoplazmik PCNA pozitifliğinin, ilk yayınlarda bildirilenin aksine, ayırıcı tanıda önemli bir yeri olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızdaki olguların Reed-Sternberg hücrelerindeki ortalama PCNA indeksi %88.0±9.6, Ki-67 indeksi %61.1±15.8 olup, mononükleer Hodgkin hücrelerindeki indeksleri ise sırasıyla %80.1±12.5 ve %54±16.0'dır. PCNA indeksi Ki-67 indeksine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur (p<0.001). Şabattini ve ark. (6), Ki-67 ve PCNA'nın HH olgularında neoplastik hücrelerin %76'sını boyadığını vurgulamışlardır. Yazarlar 25 HH olgusunun altısında PCNA indeksinin Ki-67 indeksinden çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde belirgin olarak daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bilindiği gibi Ki-67 molekülü hücre siklusunun Go fazı dışında tüm fazlarında bulunur, ancak PCNA G1 boyunca artar ve G1/S fazında pik yapar, G2 boyunca azalır ve M fazında düzeyi düşer⁽⁹⁾. Ki-67'nin geç G1 fazındaki hücrelerde negatif olması ve PCNA'nın katabolizmasının yavaşlığı nedeniyle hücre siklusunu yeni terk etmiş hücrelerin de halen düşük düzeylerde PCNA içermeleri, PCNA indeksinin Ki-67 indeksine kıyasla yüksekliğinin açıklamaktadır⁽¹⁰⁾. Ayrıca otokrin ya da parakrin büyüme faktörlerinin neoplastik hücreler üzerinde PCNA mRNA'yı stabilize edici etkisi vardır ve bu faktörler DNA sentezini uyarmaksızın, PCNA birikimine neden olur⁽¹¹⁾.

Freeman ve ark. (12) PCNA (PC10) immünreaksiyonunu 15 mikst sellüler, 15 nodüler sklerozan ve dört lenfositten fakir tipi kapsayan toplam 34 HH olgusunda araştırmışlar, Reed-Sternberg hücrelerinde PCNA pozitifliğini %73-100, mononükleer Hodgkin hücrelerinde ise %53-93 dolayında saptamışlardır. Bizim serimizdeki bu üç subtip ele alındığında ise Reed-Sternberg hücrelerinde PCNA pozitifliği %63-100, mononükleer Hodgkin hücrelerinde ise %41-100 arasında

değişen oranlardadır. Yazarlar, PCNA pozitif Reed-Sternberg hücrelerini mikst sellüler tipte %84.2±6.2, nodüler sklerozan tipte %87.0±8.3 ve lenfositlen fakir tipte %91.1±2.8 olarak bildirmişlerdir⁽¹²⁾. Mononükleer Hodgkin hücreleri yukarıdaki histolojik tiplere göre sırasıyla %75.3±10.0, %77±8.4 ve %80.0±12.0 oranlarında, diğer lenfoid hücreler ise %12.2±6.7, %12.5±8.0 ve %9.5±5.0 PCNA indeksi vermiştir⁽¹²⁾. Çalışmamızın sonuçlarına kıyaslandığında bu üç histolojik subtipde belirgin korelasyon dikkati çekmektedir.

Çalışmamızda ayrıca, lenfositlen zengin nodüler ve diffüz alttiplerde Reed-Sternberg ve Hodgkin hücrelerinde PCNA indeksi mikst sellüler tipte kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Schmid ve ark.⁽⁸⁾ sekiz nodüler lenfositlen zengin, üç mikst sellüler ve 12 nodüler sklerozan tipi kapsayan 52 HH olgusunda PCNA indeksini araştırmışlardır. Yazarlar nodüler sklerozan ve mikst sellüler tipte PCNA pozitif Reed-Sternberg ve Hodgkin hücre oranını sırasıyla %45.3 ve %45.0 olarak bildirmişlerdir. Ancak lenfositlen zengin, nodüler subtipde lenfositler-histiositer tip Reed-Sternberg hücrelerinin proliferasyon fraksiyonu %76.9 gibi çok daha yüksek oranda bulunmuştur. Bizim sonuçlarımızla kıyaslandığında yazarların saptadığı PCNA proliferasyon indekslerinin çok daha düşük olduğu dikkati çekmektedir, ancak lenfositlen zengin nodüler ve diffüz tiplerde lenfositler-histiositer tip Reed-Sternberg hücreleri ve mononükleer Hodgkin hücrelerinde benzer şekilde daha yüksek indeksler dikkati çekmektedir.

Gerdess ve ark.⁽¹³⁾ 45 HH olgusuna Reed-Sternberg hücre belirleyicisi olan Ki-1 (CD30) ve Ki-67 ile çift immün boyama uygulamışlardır. Yazarlar frozen doku kesitlerinde 100-200 Ki-1 pozitif Reed-Sternberg ve Hodgkin hücresi sayarak bunlarda Ki-67 pozitiflik oranını değerlendirmişlerdir. Tüm olgularda Reed-Sternberg ve Hodgkin hücrelerinde ortalama büyüme fraksiyonu %80 olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise tüm olgularda ortalama Ki-67 indeksi Reed-Sternberg hücrelerinde %61.1±15.8, Hodgkin hücrelerinde ise %54.0±16.0'dır. Histolojik subtiplere göre iki çalışmanın sonuçları kıyaslandığında, Gerdess ve ark.⁽¹³⁾ serisinde lenfositlen zengin tipte %78, mikst tipte %80, nodüler sklerozan tipte %83 dolayında Reed-Sternberg ve Hodgkin hücrelerinde Ki-67 pozitifliği bildirilmiştir. Bizim serimizde ise Reed-Sternberg ve Hodgkin hücrelerinde Ki-67 indeksi sırasıyla lenfositlen zengin, diffüz tipte %68.9±19.6 ve %61.6±18.5, lenfositlen zengin,

nodüler tipte %63.5±5.7 ve %57.0±6.4, mikst sellüler tipte %57.2±13.0 ve %50.5±14.3, nodüler sklerozan tipte %60.5±20.0, ve %54.0±20.2 lenfositlen fakir tipte ise %64.6±10.9 ve %54.8±10.0 olarak değerlendirilmiştir. İncelenen olgularda tümör hücresi büyüme indeksi Reed-Sternberg hücrelerinde minimal %39, mononükleer Hodgkin hücrelerinde %32 iken, Gerdess ve arkadaşlarının serisinde %53 olarak bulunmuştur. Kanımıza göre, yazarların yüksek sayıda Reed-Sternberg ve Hodgkin hücreleri içeren olguları seçerek çalışmaya dahil etmiş olmaları sonuçlarımıza kıyasla daha yüksek proliferasyon indeksleri saptamalarına neden olmuştur.

Bulgular, PCNA antikorunun HH'da zemin lenfositlerinin bir grubunda da pozitif olduğunu göstererek, bu hücrelerin de aktif olarak proliferasyon yönünde ipuçları vermektedir. Bu da lenfomalarda hücrel proliferasyon indeksi belirlenirken, tümörün heterojenizinin de göz önünde bulundurulması gerektiğini göstermektedir. Schmid ve ark.⁽⁸⁾ PCNA pozitif zemin B ve T lenfosit oranını saptamak amacıyla B ve T hücre belirleyicileri kullanılarak PCNA ile çift boyama yapmışlardır. Çalışmada, hem mikst sellüler ve nodüler sklerozan tiplerde, hem de nodüler lenfositlen zengin tipte PCNA pozitif zemin lenfositlerinin çoğu T lenfositler olarak saptanmış ve proliferasyon indekslerini %57.8 ve %68.5 olarak bildirmişlerdir. PCNA pozitif B lenfositler ise %4.3 ve %4.4 gibi çok düşük oranda bulunmuştur. Hell ve ark.⁽¹⁴⁾ 10 lenfositlen zengin, 10 nodüler sklerozis, 10 mikst sellüler ve 8 lenfositlen fakir tipte olmak üzere 38 HH olgusunu PCNA (PC10) ve B ve T hücre belirleyicileri ile çift boyama yöntemi ile incelemiş, Reed-Sternberg ve Hodgkin hücrelerinin %95-97'sinin PCNA pozitif bulmuşlar, subtipler arasında belirgin bir fark saptamamışlardır. Tüm histolojik tiplerde PCNA pozitif lenfositler %2.8-3.4 oranında bulunmuş, lenfositlen zengin tip dışındaki histolojik tiplerde zemindeki reaktif lenfosit popülasyonu %96-98 oranında T lenfositler iken, lenfositlen zengin tipte %38 oranında B lenfositler bildirilmiştir. Bizim araştırmamızda ise lenfositlen zengin, nodüler subtipin zemin lenfositlerinin PCNA ile proliferasyon indeksi %4.5 olup, diğer histolojik tiplere kıyasla çok daha düşük bulunmuştur. Bu da yeni tanımlanan bu histolojik subtipde zemindeki küçük lenfositlerin neoplastik süreçte dahil olmadıklarının göstergesi olabilir. Ancak lenfoid hücre popülasyonundaki hücrel proliferasyonun klinik öneminin belirlenmesi için daha ileri araştırmalar gerekmektedir.

HH'da Reed-Sternberg ve Hodgkin hücre popülasyonundaki bu yüksek büyüme fraksiyonu, çoğu olguda bu hücrelerin nonneoplastik hücrelere oranının oldukça düşük olması nedeniyle çarpıcı bir bulgudur. Bu bulgu, Reed-Sternberg ve Hodgkin hücrelerinin kısa ya da tersine uzun yaşam süreli hücreler olmaları veya hücre sikluslarındaki duraklama sonucu malign hücre popülasyonunun yeterince artmadığı şeklindeki hipotezlerle açıklanabilir. Bu son düşünce sitoplazmik PCNA reaksiyonunu da açıklamaktadır, çünkü yavaşlayan ya da duraklayan büyüme gösteren hücreler PCNA yapmaya devam edebilirler. Ayrıca Reed-Sternberg ve Hodgkin hücrelerinin lenfokinler gibi nonneoplastik hücreleri komşuluklarına çeken birtakım faktörler salgıladıkları bilinmektedir. Çalışmanın

sonuçları değerlendirildiğinde, HH'da Reed-Sternberg ve Hodgkin hücrelerinin çoğunun proliferasyon gösterdiği görülmektedir. Neoplastik tümör hücrelerinin büyük bir kısmının yüksek oranda PCNA ve Ki-67 pozitif olduğu göz önünde bulundurulursa, HH'nın zeminde yoğun lenfoid hücreler barındıran bir yüksek dereceleri lenfoma olarak değerlendirilmesi gerektiği sonucuna ulaşılabilir. Bu tez aynı zamanda HH'nın neden tedaviye oldukça iyi yanıt verdiğini de açıklamaktadır, çünkü sitostatik ilaçlar bilindiği gibi siklustaki hücreleri daha etkin olarak ortadan kaldırmaktadır. Ayrıca Reed-Sternberg ve Hodgkin hücrelerinin uzun yaşam süreli hücreler olduğu görüşü, olguların neden multipl tedavi kürlerine gereksinimleri olduğunu da açıklamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Weiss LM, Strickler JG, Medeiros LJ, Gerdes J, Stein H, Warnk RA. Proliferative rates of non-Hodgkin's lymphomas as assessed by Ki-67 antibody. *Hum Pathol* 1987; 18: 1155-1159.
2. Hall PA, Richards MA, Gregory WM, d'Ardenne AJ, Lister TA, Stansfeld AG. The prognostic value of Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol* 1988; 154: 223-235.
3. Kamel OW, LeBrun DP, Davis RE, Berry GJ, Warnke RA. Growth fraction estimation of malignant lymphomas in formalin-fixed paraffin-embedded tissue using anti-PCNA/Cyclin 19A2: Correlation with Ki-67 labeling. *Am J Pathol* 1991; 138: 1471-1477.
4. Benjamin DR, Gown AM. Aberrant cytoplasmic expression of proliferating cell nuclear antigen in Hodgkin's disease. *Am J Surg Pathol* 1991; 15:764-768.
5. Kamel OW, Warnke RA, Banks PM. Localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA/Cyclin) in workshop cases of Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Diagnost Pathol* 1992; 9: 311-314.
6. Sabattini E, Gerdes J, Gherlinzoni F, Poggi S, Zucchini L, Melilli G, et al. Comparison between the monoclonal antibodies Ki-67 and PC10 in 125 malignant lymphomas. *J Pathol* 1993; 169: 397-403.
7. Lukes RJ, Butler JJ. The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. *Cancer Res* 1966; 26: 1063-1081.
8. Schmid CS, Sweeney E, Isaacson PG. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in Hodgkin's disease. *J Pathol* 1992; 168: 1-6.
9. Van Dierendock JH, Wijsman JH, Keijzer R, van de Velde CJH, Cornelisse CJ. Cell-cycle related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies: Comparison with BrdUrd labelling and Ki-67 staining. *Am J Pathol* 1991; 138: 1165-1172.
10. Landberg G, Tan EM, Roos G. Flow cytometric multiparameter analysis of proliferating cell nuclear antigen/cyclin and Ki-67 antigen: A new view of the cell cycle. *Exp Cell Res* 1990; 187: 11-118.
11. Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC-W, Kellock DB, Watkins JA, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalisation in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162: 285-294.
12. Freeman J, Kellock DB, Yu CC-W, Crocker J, Levison DA, Hall PA. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and nucleolar organiser regions in Hodgkin's disease: Correlation with morphology. *J Clin Pathol* 1993; 46: 446-449.
13. Geres J, Van Baarlen J, Pileri S, Schwarting R, Van Unnik JAM, Stein H. Tumor cell growth fraction in Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1987; 129: 390-393.
14. Hell K, Lorenzen J, Hansmann ML, Fellbaum C, Busch R, Fisher R. Expression of the proliferating cell nuclear antigen in the different types of Hodgkin's disease. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 598-603.