

# Kronik Tekrarlayıcı Tonsillit-Adenotonsiller Hipertrofide Epstein Barr Virüs ve Herpes Simpleks Virüs Tip 1 Analizi\*

*The Analysis Of Epstein Barr Virus And Herpes Simplex Virus Type 1 In Chronic Recurrent Tonsillitis-Adenotonsillar Hypertrophy*

Reşit Doğan Köseoğlu<sup>1</sup>, Nurper Filiz<sup>1</sup>, İbrahim Aladağ<sup>2</sup>, Mehmet Güven<sup>2</sup>, Ahmet Eyibilen<sup>2</sup>

\* Bu çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

<sup>1</sup>Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Tokat

<sup>2</sup>Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Tokat

**Amaç:** Bu çalışmada amacımız, kronik tekrarlayıcı tonsillit/adenotonsiller hipertrofi (KTT/ATH) olgularının patogenezinde, Epstein Barr virüs (EBV) ve Herpes simpleks tip 1 virüsünün (HSV tip 1) rolünü immünohistokimyasal (IHK) ve in situ hibridizasyon (ISH) yöntemleri ile araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya toplam 50 KTT/ATH olgusunun adenotonsillektomi materyali dahil edildi. Parafin kesitlerde İHK yolla EBV LMP, EBNA-2, EBV early Ag, HSV tip-1, CD3, CD10, CD20, CD21 ve CD56 antikorları ile İSH yoluyla EBV için DNA-DNA hibridizasyonu uygulandı.

**Bulgular:** Olguların yaşları 4 ile 32 arasındaydı. Olguların 32'si kadın, 18'i erkekti. Toplam 8 olguda (%16) EBV genomu saptanırken, HSV hiç bir olguda tespit edilmedi. EBV genomu saptanan olguların tamamında ektrafolliküler lenfoid hücrelerde pozitiflik görüldü. Sadece 2 olguda ilaveten anti-EBV early antijen ile skuamöz hücrelerde de pozitiflik saptandı. İSH yöntemi ile sadece 4 olgu (%8) EBV genomu için pozitifliği. EBV genomu pozitif lenfoid hücrelerinin tamamı CD20 (+) B-lenfosit fenotipine sahipti.

**Sonuç:** Çalışmamızda EBV genomu pozitif olguların oranı (%16), literatürde rapor edilen sınırlar içerisindeydi. İSH' de saptanan pozitiflik oranının düşüklüğü (%8) işlemin uygulanmasındaki hassasiyet gerektiren sıcaklık ve nem gibi faktörlerden kaynaklanmış olabilir. EBV genomu saptanan lenfoid hücrelerin tiplendirmesi ve lokalizasyonu literatür verileri ile uyumluydu. Literatürde daha çok EBV' nin KTT/ATH ile olası ilişkisi üzerine yayınlar mevcuttur. Bu çalışmalardan anlamlı olabilecek sonuçlar elde edilmiş olmakla birlikte daha geniş seriler üzerinde yapılmış çalışmaların sonuçlarına ihtiyaç olduğu anlaşılmaktadır. HSV ile KTT/ATH arasındaki ilişkiyi araştıran makale sayısı son derece sınırlı olup olası bir ilişki den söz etmek mümkün görünmemektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *kronik tekrarlayıcı tonsillitis, adenotonsiller hipertrofi, EBV, HSV Tip 1*

**Aim:** We aimed to investigate a probable role of Epstein-Barr virus (EBV) and Herpes simplex virus type 1 (HSV type-1) by immunohistochemistry (IHC) and in situ hybridization (ISH) in pathogenesis of chronic recurrent tonsillitis/adenotonsillar hypertrophy (CRT/ATH).

**Materials and Methods:** Adenotonsillectomy materials of fifty cases with CRT/ATH were included in the study. EBV LMP1, EBNA-2, EBV early Ag, HSV tip-1, CD3, D10, CD20, CD21 and CD56 antibodies in IHC and DNA-DNA hybridization for EBV in ISH were performed on paraffin sections.

**Results:** Age of cases ranged from 4 to 32 years. Thirty-two cases were female and 18 cases were male. EBV genome was determined in 8 cases (16%), while HSV type 1 was not observed in any cases. The positive lymphoid cells for EBV were observed in extrafollicular areas of lymphoid tissues, while only 2 cases were also positive for EBV early antigen in squamous cells in addition to positive lymphoid cells in extrafollicular areas. In only 4 of cases (8%), EBV genome was determined by ISH. Postive lymphoid cells for EBV genome were CD20 (+) B-lymphocytes.

**Conclusion:** The rate of cases bearing EBV genome in our study (%16) was within the limits reported in the literature. The low rate (8%) of positive cases determined by ISH for EBV could be due to the factors such as heat and humidity of environment directly affected the results of process. The location and subtypes of positive lymphoid cells for EBV were concordant with data of literature. The articles investigating a probable relation between EBV and CRT/ATH are more than that of HSV in the literature. Although the meaningful results have been obtained from these studies, the results which will be obtained from the larger series are needed. The number of articles searching a probable relation between HSV and CRT/ATH are very few and for this reason, it is not possible to talk about a probable relation.

**Key Words:** *chronic recurrent tonsillitis, adenotonsillar hypertrophy, EBV, HSV Type 1*

Başvuru tarihi: 14.09.2007 • Kabul tarihi: 14.02.2008

İletişim

Reşit Doğan Köseoğlu  
Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı,  
Tokat  
Tel : (356) 212 95 00  
E-posta adresi: residogan@hotmail.com

Adenotonsiller hipertrofi (ATH) tekrarlayan infeksiyonlara ve üst solunum yollarında obstrüksiyona yol açan "Waldeyer" halkasını oluşturan mukozal lenfoid dokunun hiperplazisi ile karakterli bir durumdur (1). ATH' nin bir sonucu olan ve sıklıkla birlikte görülen kronik tekrarlayıcı tonsillit (KTT) ile bazı viral infeksiyonlar arasında ilişkinin olabileceği düşünülmekte ve Epstein-Barr virüsü (EBV) bu virüslerin başta gelenleri arasında yer almaktadır (2-6). EBV lenfoproliferasyonu stimüle eden ve latent infeksiyona yol açan Herpes virüs ailesi içinde yer alan bir DNA virüsüdür. Dünya popülasyonunun %90'ından daha fazlası EBV ile infektidir. Primer infeksiyon erken çocukluk çağı veya adolesan dönemde gerçekleşmekte ve klinik herhangi bir semptom ortaya çıkmamaktadır (3,7,8). EBV için iki hedef hücre vardır; nazofarenks-orofarenks epitel hücreleri ve B-lenfositler. EBV infeksiyonunda ilk hedef hücre orofarenksin epitel hücreleridir (6). İnfekte olan B-lenfositler ölümsüz hücre soylarına transforme olarak sınırsız bir biçimde proliferasyon yeteneği kazanırlar (9). Literatürde KTT/ATH ile Herpes simpleks virüs (HSV) arasındaki ilişkiyi araştıran sayıda çok az çalışma mevcuttur (10). Aradaki ilişki için kesin bir yargıya varmak mümkün görünmemektedir.

Bu çalışmadaki amacımız, ATH/KTT nedeniyle adenotonsillektomi yapılan olgularda, EBV ve HSV pozitiflik oranını saptamak, infekte hücrelerin mukozal lenfoid doku kompartmanlarındaki dağılımını belirlemek, lenfosit subtipleri ile ilişkilerini analiz etmek ve İSH (in situ hibridizasyon) ile İHK (immünohistokimya) yöntemleri arasında EBV' yi saptama açısından fark olup olmadığını tayin etmektir.

## Gereç ve Yöntem

**Olguların seçimi:** 2003 ve 2005 yılları arasında KTT/ATH nedeni ile tonsillektomi ve adenoidektomi operasyonu geçirmiş toplam 50 hastanın adenotonsillektomi materyali çalışmaya dahil edildi. Elli olguya ait operasyon materyalinin 34'ü tonsillektomi 16'sı adenoidektomi materyali idi. Çalışmaya dahil edilen olguların adenotonsillektomi materyalleri önceden histopatolojik olarak "KTT/ATH" tanısı almış olgulardı. Çalışma öncesinde tüm olgulara ait hematoksilen-eozin boyalı kesitler tekrar gözden geçirilerek tanıları teyit edildi.

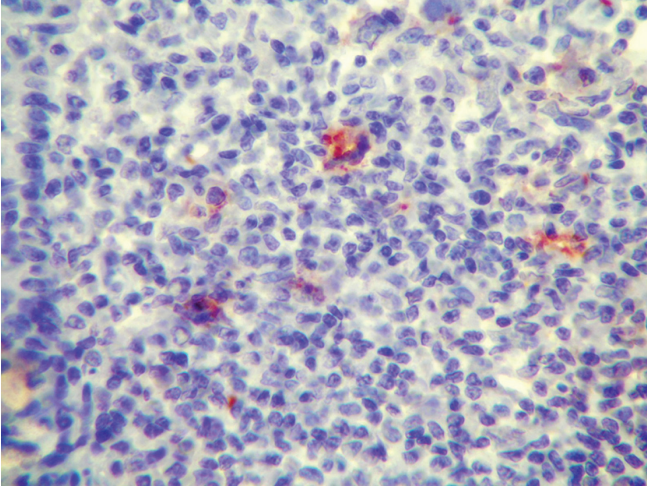
**Uygulanan analiz yöntemleri:** İHK ve İSH yöntemleri parafin bloklardan hazırlanan 4 mikrometre kalınlığındaki kesitler üzerinde uygulandı. İHK' de streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile EBV LMP1 (EBV Latent Membran Proteini-1, Neomarkers, ABD), EBNA-2 (EBV Nükleer Antijen-2, Novocastrol, İngiltere), EBV early antijen (Novocastrol, İngiltere), HSV Tip 1 (Neomarkers, ABD), CD3 (Neomarkers, ABD), CD10 (Neomarkers, ABD), CD20 (Neomarkers, ABD), CD21 (Neomarkers, ABD) ve CD56 (Neomarkers, ABD) analiz edildi. İHK' de pozitif kontrol olarak lenf düğümü ve nazofarenks karsinomu dokuları kullanıldı. İHK' de EBV LMP1;1/25, EBNA-2;1/25, EBV early antijen;1/100, HSV-tip1;1/100, CD3;1/30, CD10;1/30, CD20;1/400, CD21;1/20 ve CD56;1/100 dilüsyonlarında kullanıldı. İSH' de EBV için digoksin ile işaretlenmiş spesifik DNA oligoproblarını içeren İSH kiti (PanPath Rembrandt in situ hybridisation and detection kit, Hollanda) kullanıldı. İSH uygulamasında 4 mikrometre kalınlığında hazırlanmış tonsil ve adenoid doku kesitlerinde deparafinizasyon ve "pretreatment" işlemlerinden sonra pepsin

ve HCL kullanılarak proteolizis işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra digoksin ile işaretlenmiş EBV için spesifik DNA oligoproblarının kullanıldığı hibridizasyon işlemi, anti-digoksin antikorları kullanılarak olası pozitif reaksiyonları belirleyecek saptama aşaması ve takiben zemin boyama aşaması ile işlem tamamlandı. Pozitif kontrol olarak kit içinde sunulan pozitif kontrol lamları kullanıldı.

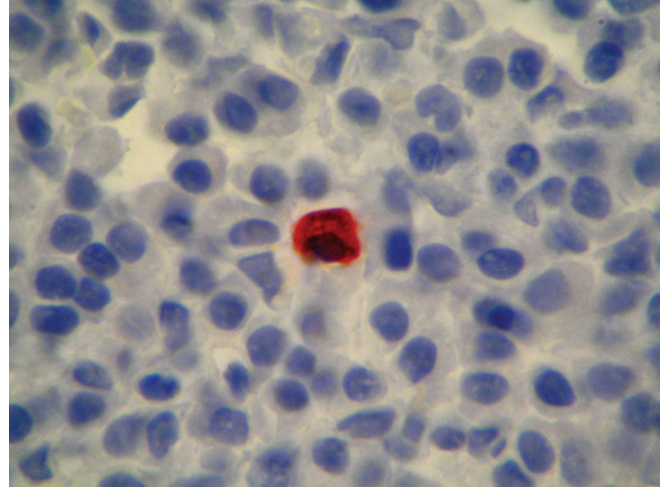
**Değerlendirme:** EBV ve HSV tip-1 ile infekte hücrelerin değerlendirilmesinde, tonsil ve adenoidlerde lenfoid ve epitelial doku komponentleri, ışık mikroskopunda pozitif boyanma gösteren hücrelerin varlığı için tarandı. İHK yolu ile uygulanan EBV LMP1 için sitoplazmik, EBV early antijen ve HSV-tip-1 için sitoplazmik ve nükleer, EBNA-2 için nükleer boyanma araştırıldı. İSH yolu ile araştırılan EBV DNA oligoprobları için yine nükleer boyanma anlamlı olarak yorumlandı. EBV ve HSV tip-1 için pozitif lenfositlerin CD3, CD10, CD20, CD21 ve CD56 İHK belirleyicileri ile pozitif reaksiyon verip vermedikleri yine ışık mikroskopu ile değerlendirilerek viral genom için pozitif lenfoid hücrelerin tiplendirilmesi yapıldı. Lenfosit tiplendirmesinde kullanılan belirleyiciler için membranöz boyanma anlamlı olarak değerlendirildi. İHK ve İSH belirleyicileri ile saptanan nükleer ve sitoplazmik boyanma, şiddetine ve yaygınlığına göre derecelendirilmedi. Boyanma var/yok şeklinde değerlendirme yapıldı.

## Bulgular

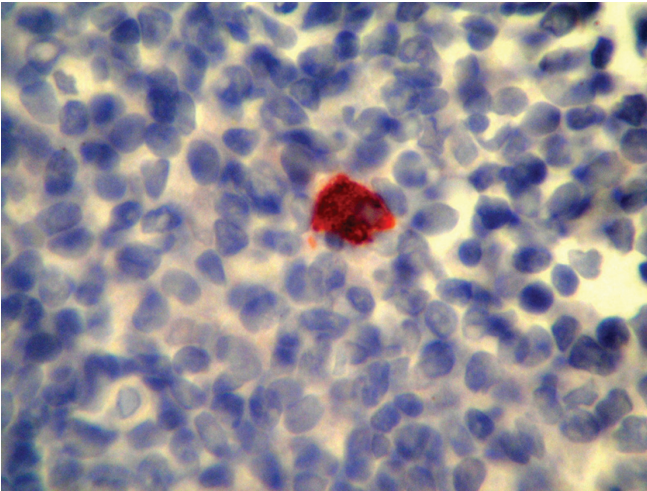
Hastaların yaş aralığı 4-32 arasında değişmekteydi. Olguların 18'si erkek, 32'si kadın hastalardı. EBV LMP1 ile 7 olguda (%14) (5'i tonsil, 2'si adenoid) pozitif reaksiyon izlendi. EBNA-2 ile 3 olguda (%6)



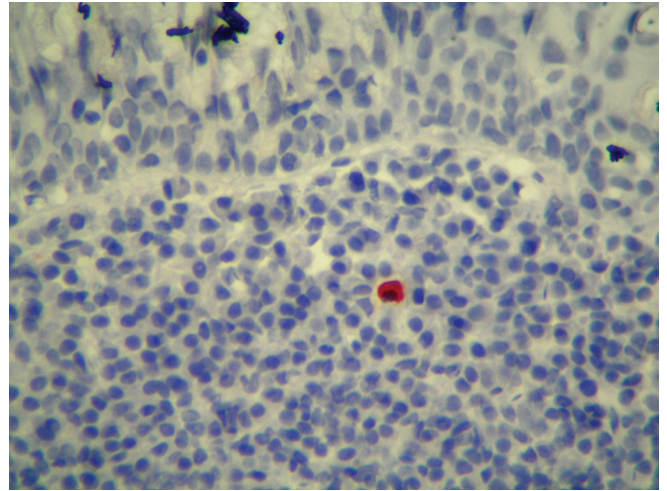
**Şekil 1:** EBV LMP1 ile yoğun pozitifliğin izlendiği lenfositler (anti-EBV LMP, AEC, x160).



**Şekil 2:** Lenfoid dokuda bir lenfositte EBNA-2 ile izlenen pozitiflik (anti-EBNA-2, AEC, x400).



**Şekil 3:** EBV early antijen ile bir lenfositte izlenen pozitiflik (anti-EBV early Ag, AEC, x400).

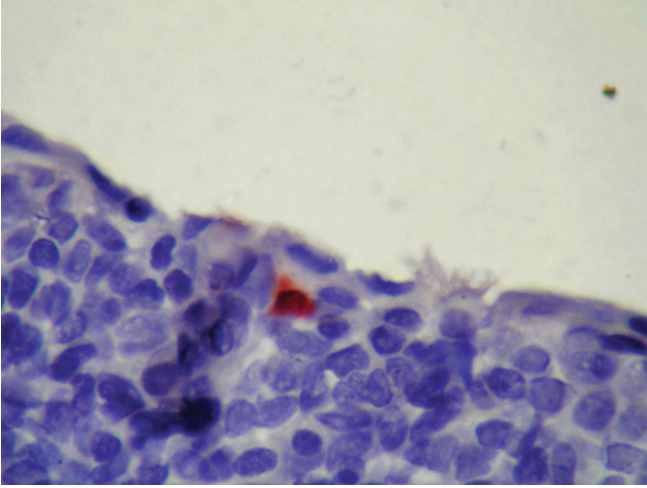


**Şekil 4:** Submukozal lenfoid dokuda EBV early antijen ile izlenen pozitiflik (anti-EBV early Ag, AEC, x160).

(2'si tonsil, 1'adenoid) ve EBV early antijen ile 8 olguda (%16) (5'i tonsil, 3'ü adenoid) pozitif boyanma saptandı. EBV İSH' da ise sadece 4 olguda (%8) pozitif reaksiyon belirlendi. EBV LMP1 pozitifliği saptanan olguların tamamında EBV early antijen pozitifliği mevcut idi. EBNA-2 pozitifliği saptanan 3 olgu da EBV LMP1 pozitif olan olgulardı. İSH' de pozitiflik saptanan olgular EBV LMP1 ve EBV early antijen pozitif olan olgulardı. Hem İSH hem de İHK ile saptanan EBV pozitif hücreler ekstrasfolliküler

lokalizasyondaki lenfoid hücrelerdi (Şekil 1-4). EBV pozitifliği izlenen lenfoid hücrelerin tamamında CD20 ile pozitif reaksiyon izlendi. Beş olgudaki EBV genomu pozitif lenfoid hücrelerde CD20 pozitifliğine ek olarak CD21 pozitifliğine de saptandı. CD21 pozitifliği izlenen olguların 3'ü adenoid dokusu, 2'si tonsil dokusu üzerinde çalışılan olgulardı. EBV pozitifliği gösteren olguların hiçbirinde CD3, CD10, CD56 ile pozitiflik izlenmedi. İki olguda EBV early antijen ile mu

kasında çok seyrek olarak 2-3 kadar keratinositte pozitiflik izlendi (Şekil 5). EBV genomu pozitifliği gösteren olguların belirleyicilere göre ve doku kompartmanlarına göre dağılımı tablo 1'de özetlenmiştir. EBV genomu saptanan 8 olgunun yaş aralığı 9 ile 30 arasındaydı. Dört olgu 15 yaş ve altı iken diğer 4'ü 15 yaş üstündeki olgulardı. EBV genomu pozitif olguların 3'ü kadın 5'i erkek hastalardı (Tablo 2).



**Şekil 5:** Mukozal skuamöz epitelin üst tabakasındaki bir keratinositte EBV early antijen ile izlenen pozitiflik (anti-EBV early Ag, AEC, x400).

nin in vivo ortamda replikasyon yeri konusunda tartışmalar hala olmakla birlikte farengel epitel hücreleri ile oral hairy lökoplaki lezyonlarının virüs replikasyonuna doğal olarak açık oldukları anlaşılmaktadır (14,15). İHK ve PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile yapılan çalışmalarda hem differansiye skuamöz hücrelerde hem de B-lenfositlerde, EBV litik proteinleri ve litik gen transkriptlerinin bulunduğu saptanmıştır (16). Do-

layısı ile skuamöz hücreler dışında B-lenfositler de replikasyon yeri olarak kabul edilmektedir. Oro-nazofarenks bölgesine tropizması olan EBV' nin lenfoproliferasyon ile ilişkisini ortaya koymaya çalışan çalışmalar mevcuttur. Perez ve ark. KTT/ATH' li çocuk hastaların doku örneklerindeki analizlerinde, EBV genomu saptamadıklarını rapor etmişlerdir (17). Lones ve ark. post-transplantasyon lenfoproliferatif hastalıklı (PTLD) 3 hastanın tonsil

## Tartışma

EBV' nin gen ekspresyon paternleri latent ve litik infeksiyon durumlarında farklılık göstermektedir (11). Latent infeksiyon en iyi B lenfoblastoid hücre soylarında karakterize edilmektedir. Bu hücrelerin in vitro deneylerde EBV infeksiyonu sonucu sonsuz çoğalabilen ölümsüz hücre soyu özelliği kazandıkları gösterilmiştir. Latent EBV infeksiyonu barındıran B hücre lenfoblastoid hücre soylarında EBNA 1-6, LMP 1, 2A, 2B ve EBER1, EBER2 (EBV encoded small RNAs) ile BARF0 ekspresyonları görülmektedir (12,13). EBV'

ve adenoidlerinde PZR, İSH ve İHK ile yaptıkları analizlerde, PTLD ile EBV' nin ilişkisine dikkat çekmiştir (18). Neoplastik ve non-neoplastik nazofarenks doku örneklerinde gerçekleştirilmiş çalışmalarda nazofarenjitis ve nazofarenks kanser olgularında B-lenfositler ve non-neoplastik epitel hücrelerinde EBV gen ekspresyonları saptanmış ve söz konusu patolojiler ile EBV arasında patogenetik bir ilişkinin olabileceği ileri sürülmüştür

EBV antijenleri	Pozitif olgu sayısı	Ekstrafoliküler alanda pozitiflik gösteren olgu sayısı	Skuamöz epitelde pozitiflik gösteren olgu sayısı
EBV LMP1	7	7	-
EBNA-2	3	3	-
EBV early Ag	8	8	2
EBV İSH	4	4	-
Toplam EBV genomu pozitif olgu sayısı	8	7	2

Kısaltmalar; EBV; Epstein-Barr virüs, LMP1; Latent Membran Protein 1, EBNA-2; EBV Nükleer Antijen 2, early Ag; early Antijen, İSH; İn Situ Hibridizasyon.

**Tablo 1:** EBV genomu saptanan olguların belirleyicilere göre ve EBV genomunun saptandığı lokalizasyona göre sayısı.

Olgular Yaş/cinsiyet	Çalışılan doku	EBV early Ag	EBV LMP1	EBNA-2	CD20	CD21	İSH
9/K	Adenoid	+	+	-	+	+	-
11/E	Tonsil	+	+	-	+	+	-
13/E	Adenoid	+	+	+	+	+	+
15/K	Adenoid	+	+	-	+	+	+
22/K	Tonsil	+	+	+	+	+	-
25/E	Tonsil	+	+	+	+	-	+
27/E	Tonsil	+	-	-	+	-	+
30/E	Tonsil	+	+	-	+	-	-

**Tablo 2:** EBV genomu saptanan olguların belirleyicilere göre dağılımı.

(19,20). Bir başka çalışmada da LMP ekspresyonunun nazofarenks epitelinde proliferasyon ve dediferansiyasyondan sorumlu olabileceği konusunda bulgular rapor edilmiştir (21). Zeidler ve ark. taze rezeke edilmiş adenoidlerden izole ettikleri lenfoid hücrelerin, in vitro ortamda EBV enfeksiyonuna yanıt olarak çok hızlı proliferasyon göstermiş ve B lenfositler üzerinde EBV reseptörü CD21'in yüksek konsantrasyonlarda ekspresyon edildiğini ve bu ekspresyonun tonsillere göre daha yüksek düzeylerde olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak yüksek konsantrasyonlarda CD21

ekspresyonunun, EBV enfeksiyonu için yatkınlık yaratabileceği ileri sürülmüştür (22). Bizim çalışmamızda, EBV genomu pozitif lenfositlerin tiplendirilmesinde, EBV genomu içeren lenfoid hücrelerin 5 olguda CD20' ye ek olarak CD21 için de pozitif oldukları saptandı ve bu olguların 3'ü adenoidektomi materyalinde çalışılmış olgular idi. Bu bulgular, Zeidler ve ark' nın ileri sürdükleri görüşü (22) destekleyebilir niteliktedir. Belirsiz kalan bir durum EBV için saptanan replikasyon yerlerinin sağlıklı kişilerde de geçerli olup olmadığıdır. Tonsillerin, EBV replikasyonu için en başta gelen organlar olduğu be-

lirilmektedir (23,24). Kobayashi ve ark. tarafından DNA-DNA İSH ve in situ PZR kullanılarak yüksek sayıda EBV DNA kopyası non-neoplastik tonsillerin üst skuamöz epitel katmanlarında saptanmıştır (24). Bir başka çalışmada periferik B-lenfositlerde sadece epizomal formda EBV DNA gösterilmişken, tonsiller lenfositlerde epizomal form ile birlikte aktif replikasyona işaret eden lineer formlar da saptanmıştır (23).

Literatürde KTT/ATH ile viral enfeksiyonların ilişkisini sorgulayan çalışmalar mevcuttur. Yamanaka ve arkadaşları viral enfeksiyonların et-

Yöntem/özellikler	İSH	İHK	PZR
<b>Metodun prensibi</b>	İşaretili DNA yada RNA problemleri kullanılarak viral nükleik asitin enfekte hücrede saptanması	Antijenik epitoplara karşı geliştirilmiş işaretili antikorlar ile virüsün immünolojik temelde tespiti	Bilinen viral nükleik asit sekansının çoğaltılarak tespit edilebilir hale getirilmesi
<b>Lokalizasyon</b>	Doku hücre mimarisi korunarak pozitif sinyalin hücre kompartımanları düzeyinde lokalizasyonu	Doku hücre mimarisi korunarak pozitif sinyalin hücre kompartımanları düzeyinde lokalizasyonu	Doku hücre mimarisi korunamaz, nükleik asit ekstraksiyonu gereklidir.
<b>Avantajları</b>	Morfolojinin korunması, lokalizasyon imkanı	Morfolojinin korunması, lokalizasyon imkanı	Daha yüksek sensitivite
<b>Dezavantajları</b>	Sensitivite düşüklüğü (yanlış negatiflikler olabilir)	Sensitivitenin diğer iki yöntemle göre düşüklüğü	Amplifikasyon nedeni ile yanlış pozitifliklere yol açabilen aşırı sensitivite

**Tablo 3:** İHK, İSH ve PZR yöntemlerinin avantaj ve dezavantajlarının karşılaştırması.

kisi ile palatin tonsillerde lenfosit fonksiyonlarının deprese olduğunu ve bakteriyel infeksiyonlara duyarlılığın arttığını ifade etmişlerdir (2). Kunimoto ve ark (3) PZR yöntemi ile KTT/ATH' li çocuk hastaların %64'ünde EBV genomu saptadıklarını, Yoda ve ark (4) da akut tonsillitisli hastaların %26'sında İSH yöntemiyle EBER saptadıklarını rapor etmişlerdir. Kobayashi ve ark. ise KTT' li hastaların %28,2'sinin EBER-1 için pozitif olduğunu göstermişlerdir (24). Endo ve ark ise yaş aralığına göre yaptıkları iki farklı çalışmalarında, 2 yaş altındaki 21 çocuktan 7'sinde (%33), 2-14 yaş aralığındaki 85 çocuktan 25'inde (%29,4) EBV genomu pozitifliği rapor etmişlerdir (1,6). Endo ve ark. bir diğer çalışmalarında da, 2-13 yaş aralığındaki adenoid hiperplazili çocukların %72'sinin adenoid doku örneklerinde İSH ile EBV genomu saptamışlardır (25). Bizim çalışmamızdaki EBV genomu pozitifliği ise %16 olarak belirlendi. Bu oran, EBV early antijeni pozitiflik oranıdır. EBV LMP1 ile 7 olguda (%14), EBNA-2 ile 3 olguda (%6) ve İSH ile 4 olguda (%8) pozitif sinyal elde edildi. EBV early antijeni için pozitif olan olgular, diğer tüm belirleyiciler ile pozitiflik gösteren olguları da kapsadığından, çalışmamızdaki EBV pozitif olgu oranını temsil etmekteydi. Literatürde rapor edilmiş olan EBV pozitif olguların oran aralığı %0-72 arasında değişmektedir (1,4,6,17,24,25). Çalışmamızdan elde ettiğimiz oran bu aralığın içindedir. Ancak, daha duyarlı bir metot olarak kabul gören ve literatürde EBV için daha yüksek pozitiflik oranlarının elde edildiği rapor edilmiş olan İSH (1,4,6,17,24,25) ile çalışmamızda elde ettiğimiz pozitiflik oranı (%8) belirgin derecede daha düşük kalmıştır. Bunu İSH' de etkili olan ve hassasiyeti etkileyen bazı faktörlere (ortam ısı, nem gibi) bağlayabiliriz. Endo ve ark' nin iki ayrı çalışmalarında

dikkati çeken bir diğer konu, yaşa göre EBV genomu pozitifliğinde bir farkın olabileceğinin ileri sürülmesiydi. Söz konusu araştırmacıların çalışmalarında 2 yaş altı ve üstü çocuklarda EBV genomu pozitifliği açısından önemli farkın olduğuna ve 2 yaş üstündeki çocuklarda pozitiflik oranının belirgin derecede yükseldiğine dikkat çekilmiştir (1,25). Bizim çalışmamızda pediatrik yaş gurubu hedeflenmemiş idi. EBV için pozitif olguların yaş aralığı 9 ile 30 arasında değişmekteydi ve belli bir yaşın altında ya da üstünde pozitiflik oranında değişiklik olduğu yönünde yorum yapmak mümkün değildi. EBV genomu pozitif olgularımızın 4'ünün yaşı 15'in altındaydı.

Literatürde KTT/ATH' de EBV pozitif olguların oranının analiz edildiği çalışmalarda aynı zamanda EBV genomu için pozitif lenfoid hücrelerin, lenfoid doku kompartmanlarındaki dağılımının da incelenmiş olduğu dikkati çekmektedir. EBV pozitif lenfoid hücrelerin özellikle ekstrasfolliküler kompartmanda yoğunlaştığı rapor edilmiştir (6,26). Bazı çalışmalarda ise lenfoid dokuya ek olarak mukozal epitel hücrelerinde de pozitif sinyaller rapor edilmiştir (20,27). Bizim çalışmamızda İHK belirleyicileri (LMP1, early antijen ve EBNA-2) ile ağırlıklı olarak tonsillerde (5 olguda) pozitiflik saptandı. Tüm pozitif olgularda lenfoid dokudaki EBV pozitifliği ekstrasfolliküler mesafelerde izlendi. Üç olguda ekstrasfolliküler mesafedeki pozitiflik subepitelyal mesafeler olarak saptandı. EBV early antijen ile 2 olguda lenfoid hücrelerin yanında, lenfoid dokuyu örten skuamöz epitelde de seyrek bir kaç hücrenin sitoplazmasında pozitiflik dikkati çekti. Bu da EBV' nin B-lenfositler yanında nazo-orofarenksin skuamöz epitel hücrelerinde de latent halde buldukları ve viral replikasyona katkıda buldukları bilgisi

ile uyumlu olarak değerlendirildi (16,20,24). EBV genomu pozitif lenfoid hücrelerin İHK ile tiplendirilmesi, literatürdeki çalışmalarda dikkati çeken bir diğer konudur. Endo ve ark' nin çalışmasında EBV genomu içeren hücrelerin CD20 pozitif B-lenfositler olduğu gösterilmiştir (1). Bizim çalışmamızda da EBV pozitif olguların tümünde, EBV genomu içeren lenfoid hücreler CD20 pozitif B-lenfositlerdi.

Literatür tarandığında HSV ile KTT arasındaki ilişkiyle ilgili son derecede az yayının mevcut olduğu dikkatimizi çekti (10). Tanaka'nın çalışmasında akut tonsillitisli 42 hastada EBV ve HSV genomları İHK, İSH ve ultrastrüktürel yöntemler ile araştırılmış ve sadece 2 hastanın tonsil doku örneklerinde HSV pozitifliği saptandığı rapor edilmiştir. Çalışmamızda HSV tip 1 belirleyicisi ile hiç bir olgunun adenoid ve tonsil dokularında pozitiflik saptanmadı. Çalışmamıza göre HSV tip 1 ile KTT/ATH arasında bir ilişkinin varlığından söz etmemiz mümkün görünmemektedir.

EBV' nin insan doku ve hücrelerinde analizi ileri teknoloji gerektiren bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Metotlar arasında daha basitinden daha karmaşık olana doğru İHK, İSH ve PZR gelmektedir. İdeal metot basit, duyarlı ve viral sinyalin lokalizasyonunu yapmaya imkan sağlayacak özelliklerde olmalıdır. Diğer metotlar ile karşılaştırıldığında PZR daha yüksek pozitiflik sağlama özelliğine sahip olarak yüksek duyarlılık göstermekte ancak patolojik olmayan hücrelerdeki mevcut viral genomun çoğaltılması nedeniyle yanlış pozitiflik sorunu gündeme gelmektedir (28). Ayrıca PZR ile viral genomun morfolojik olarak nerede lokalize olduğunu gösterme imkanı bulunmamaktadır. Diğer yöntemlerin özellikleri ve her 3 yöntemin karşılaştırması tablo

3'de özetlenmiştir.

Literatürdeki çalışmaların ve bizim çalışmamızın sonuçlarından anlaşılabilir gibi viral etkenler ile KTT/ATH arasında olası bir ilişkiden söz etmek mümkün olabilir ancak kesin bir yargıya varmak için daha

fazla veriye ihtiyaç vardır. EBV'nin, literatürde daha yaygın olarak araştırılmış olduğu görülmekte ve anlamlı olarak yorumlanabilecek sonuçların elde edildiği anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, HSV ile KTT/ATH arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için yapılmış çalışmalar

çok sınırlı sayıdadır. Söz konusu viral ajanları dokularda saptamaya yönelik yöntemlerin duyarlılıkları arasında farklar olduğu, duyarlılığı yüksek olan araştırma yöntemlerinin uygulanmasında güçlüklerin bulunduğu ve maliyetlerinin yüksek olduğu görülmektedir.

#### KAYNAKLAR

- Endo LH, Vassallo J, Sakano E et al. Detection of Epstein-Barr virus and subsets of lymphoid cells in adenoid tissue of children under 2 years of age. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2002; 66: 223-226.
- Yamanaka N and Kataura A. Viral infection associated with recurrent tonsillitis. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1984; 416(Suppl.): 30-37.
- Kunimoto M, Tamura S, Yoshie O et al. Epstein-Barr virus in Waldeyer's lymphatic tissue. *Adv Otorhinolaryngol Basel, Karger* 1992; 47: 151-160.
- Yoda K, Aramaki H, Yamauchi Y et al. Detection of herpes simplex and Epstein-Barr viruses in patient with acute tonsillitis. *Abstracts III International Symposium on Tonsils June 21-23, Sapporo, Japan, 1995.* p. 31.
- Hirao M, Harabuchi Y, Kataura A et al. Immunological role of human palatine tonsil in Epstein-Barr virus persistence. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1996; 523(Suppl.): 158-160.
- Endo LH, Ferreira D, Montenegro MCS et al. Detection of Epstein-Barr virus in tonsillar tissue of children and the relationship with recurrent tonsillitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2001; 58:9-15.
- Stewart JP and Arrand JR. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein in nasopharyngeal carcinoma biopsy specimens. *Hum Pathol* 1993; 24: 239-242.
- Niedobitek G, Agathangelou A, Herbst H et al. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV infected cells. *J Pathol* 1997; 182; 151-159.
- Smith RD. Epstein-Barr virus: a ubiquitous agent that can immortalize cells. *Hum Pathol* 1993; 24: 233-234.
- Tanaka N. Infection of herpes simplex virus (HSV) and Epstein-Barr (EBV) in acute tonsillitis-histopathological assessment by optical and electron microscopic observation of biopsy specimens of tonsils. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 2001; 104: 1093-1102.
- Kerr BM, Lear AL, Rowe M et al. Three transcriptionally distinct forms of Epstein-Barr virus latency in somatic cell hybrids: cell phenotype dependence of virus promoter usage. *Virology* 1992; 187: 189-201.
- Ring CJA. The B cell-immortalizing functions of Epstein-Barr virus. *J Gen Virol* 1994; 75: 1-13.
- Sadler RH and Raab-Traub N. Structural analyses of the Epstein-Barr virus BamHI A transcripts. *J Virol* 1995; 69; 1132-1141.
- Young LS, Lau R, Rowe M et al. Differentiation-associated expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator protein in oral hairy leukoplakia. *J Virol* 1991; 65: 2868-2874.
- De Souza YG, Greenspan D, Felton JR et al. Localization of Epstein-Barr virus DNA in the epithelial cells of oral hairy leukoplakia by in situ hybridization on tissue section. *N Engl J Med* 1989; 320: 1559-1560.
- Prang NS, Hornef MW, Jager M et al. Lytic replication of Epstein-Barr virus in the peripheral blood: analysis of viral gene expression in B lymphocytes during infectious mononucleosis and in the carrier state. *Blood* 1997; 89: 1665-1677.
- Perez AF, Mari JMN, Garcia JMA et al. Role of viral reactivation in recurrent adenoiditis and tonsillitis in children. *Acta Otorhinolaryngol Espanhola* 1989; 40: 277-278.
- Lones MA, Mishalany S, Shintaku IP et al. Changes in tonsils and adenoids in children with posttransplant lymphoproliferative disorder: report of three cases with early involvement of Waldeyer's ring. *Hum Pathol* 1995; 26: 525-530.
- Takimoto T, Tanaka S, Ishikawa S et al. The human nasopharynx as a reservoir for Epstein-Barr virus. *Auris Nasus Larynx* 1989; 16: 109-115.
- Zhang HY, Qu G, Deng ZW et al. Epstein-Barr virus DNA in nasopharyngeal biopsies. *Virus Res* 1989; 12: 53-59.
- You S, Yao K, Cao Y. Latency of Epstein-Barr virus and its relationship to nasopharyngeal carcinomas. *Chung Hua Chung Liu Tsa Chih* 1996; 18: 23-26.
- Zeidler R, Meissner P, Eissner G et al. Rapid proliferation of B cells from adenoids in response to Epstein-Barr virus infection. *Cancer Res* 1996; 56: 5610-5614.
- Babcock GJ, Decker LL, Volk M et al. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* 1998; 9: 395-404.
- Kobayashi R, Takeuchi H, Sasaki M et al. Detection of Epstein-Barr virus infection in the epithelial cells and lymphocytes of non-neoplastic tonsils by in situ hybridization and in situ PCR. *Arch Virol* 1998; 143: 803-813.
- Endo LH, Rezende D, Pinto GA et al. Proceedings of the Seventh International Congress of Pediatric Otorhino-laryngology, June 7-10, 1998, Helsinki, Finland. Detection of Epstein-Barr virus on palatine tonsil and the relationship to recurrent tonsillitis. *Adv. Ped. Otorhinolaryngol.* (1998) CD ROM.
- Niedobitek G, Herbst H, Young LS et al. Patterns of Epstein-Barr virus infection in non-neoplastic lymphoid tissue. *Blood* 1992; 79: 2520-2526.
- Chen CL, Hsu MM, Hsu HC. Differential expression of EBV1 in non tumor nasopharyngeal carcinoma. *Intervirology* 1996; 39: 230-235.
- Pinto GA and Irazusta SP. EBV-Virus do Epstein-Barr Cap (9) In: *Manual de Imunohistoquímica, Sociedade Brasileira de Patologia, Sao Paulo; 1995.* p. 58-61.