

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ'DE ZAP-70'İN
PROGNOSTİK ÖNEMİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. DERYA AYDIN**

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. MÜNCİ YAĞCI**

ANKARA – 2007

TEŞEKKÜR

Her zaman bana her türlü desteği veren anne, babama ve eşime, iç hastalıkları uzmanlık eğitimim süresinde destek ve ilgisini esirgemeyen İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Candan TUNCER başta olmak üzere tüm hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma, tezimle ilgili çalışmamın her aşamasında destek olan ve yol gösteren tez danışmanım Doç. Dr. Münci YAĞCI'ya ve emeği geçen herkese en içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Derya AYDIN

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	1
GİRİŞ.....	2
GENEL BİLGİLER.....	3
I. KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ.....	3
1.Tanı.....	3
2.Klinik	4
3.Klinik Evreleme.....	4
4.Prognoz.....	5
4.1.Klinik Prognostik Faktörler.....	6
4.2.Serolojik Belirteçler.....	8
4.3.Yeni Biyolojik Faktörler.....	9
4.4.Diğer Prognostik Faktörler.....	14
II.ZAP-70.....	15
GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	22
BULGULAR.....	23
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	31
ÖZET.....	38
KAYNAKLAR.....	39
ETİK KURUL KARARI.....	51

KISALTMALAR

ATM: Ataksi telanjektazi mutasyonu

ZAP-70: Zeta zinciri ilişkili protein 70

BCR: B Hücre reseptör kompleksi

BK: Beyaz küre

β 2MG: β 2 mikroglobulin

DNA: Deoksiribo nükleik asit

FISH: Flöresans in situ hibridizasyon

Hb: Hemoglobin

ICAM1: İntraselüler adezyon molekülü 1

Ig: İmmünglobulin

IgVH: İmmünglobulin ağır zincir değişken bölgesi

IL-6: İnterlökin 6

IL-10: İnterlökin 10

KLL: Kronik lenfositik lösemi

LDH: Laktat dehidrogenaz

LKS: Lenfosit katlanma süresi

NCI-WG: National Cancer Institute-Working group

NK: Naturel killer

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

Plt: Platelet

sCD23: Solubl CD23

TK: Timidin kinaz

TNF: Tümör nekrozis faktör

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

GİRİŞ

Kronik lenfositik lösemi, batı toplumunda, erişkinlerde en sık görülen lösemi türüdür (31). KLL'nin klinik seyri son derece değişkendir (5). Bazı hastalarda yavaş seyirli hastalık görülür ve tedavi gerekmez. Kimi olgularda, tanıdan kısa bir süre sonra tedavi gereksinimi olur (39). Toplam sağkalım aylar ile sınırlı olabileceği gibi dekadlar ile ifade edilebilecek kadar uzun olabilir (5). KLL'nin değişken klinik seyrinden dolayı hızlı seyredecek hastaları önceden belirlemek çok önemlidir.

Rai (60) ve Binet (2) tarafından geliştirilen klinik evreleme sistemleri, erken evrede tanı konmuş hastalardan hangilerinin hızlı seyredeceğini saptamada yetersizdir (5). Bu nedenle KLL'de prognozu belirlemeye yardımcı çeşitli prognostik faktörler tanımlanmıştır. Bunlar arasında, LDH, β 2MG, TK, sCD23 gibi serolojik belirteçler, LKS, kemik iliği infiltrasyon tipi, IgVH mutasyon durumu, sitogenetik anormallikler, lösemik hücrelerde CD38 ve ZAP-70 ifadelenmesi sayılabilir (5,75).

ZAP-70, T hücre reseptör sinyali ilişkili intraselüler tirozin kinazdır (7,8,46). Lösemik hücrelerde, ZAP-70 ifadelenmesinin %20'den fazla olması kötü prognostik özelliktir. ZAP-70 ifadelenmesi, B-KLL'de hastalık ilerlemesi ve toplam sağkalımın önemli bir belirleyicisi olarak tanımlanmıştır (13,25,36,56,63).

Çalışmamızda, ileriye dönük olarak izlenen çoğunluğu erken evre KLL'li olgularımızda, ZAP-70 ifadelenme sıklığını, ZAP-70 ifadelenmesinin tedavi gereksinimi üzerine etkisini ve diğer prognostik faktörlerle olan ilişkisini inceledik.

GENEL BİLGİLER

I. KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ

KLL, monoklonal CD5 pozitif B lenfositlerinin periferik kan, kemik iliği ve ikincil lenfoid organlarda (lenf nodu ve dalak) toplanması ile şekillenen bir hastalıktır (11,31).

KLL, batı toplumunda, erişkinlerde, en sık görülen lösemi türüdür (31). Bu ülkelerde yaşayan 65 yaşının üstündeki kişilerde gelişen lösemilerin % 40'ını oluşturur (65). Genç yaşta görülmesi nadir olmasına karşın KLL hastalarının % 20-30'u 55 yaş altındadır (6). KLL, erkeklerde kadınlara göre daha sık gözlenir ve E/K oranı yaklaşık olarak 1,5 - 2,1:1'dir (31).

KLL'li olguların periferik yaymasında, çok az stoplazması olan, homojen, olgun lenfositler izlenir. Hücre membranları oldukça frajildir ve sıklıkla preparatın hazırlanma aşamasında lösemik hücreler rüptür olurlar. KLL B lenfositlerinin yüzeylerinde CD19, CD20, CD5 ve CD23 ifadelenir. Tipik olarak düşük derecede yüzey immünglobulini taşırlar (sıklıkla IgM ± IgD ve düşük oranda IgG ya da IgA). Lösemik hücreler monoklonal olduğu için kappa ya da lambda hafif zincirlerinden sadece biri ifadelenir (31).

1. Tanı

NCI-WG ölçütlerine (10) göre aşağıdaki durumların varlığında KLL tanısı konulabilir:

1. Periferik kanda 1 aydan uzun süredir $5 \times 10^9 / L$ 'den fazla olgun görünümlü lenfosit olması
2. Akım sitometri ile aşağıdaki özelliklerin saptanması
 - a. B lenfositler sadece kappa veya lambda ifadelenmesiyle gösterildiği gibi monoklonaldır
 - b. CD19 + CD5'le birlikte CD23 ifadelenmesi
 - c. Yüzey Ig'nin düşük derecede ifadelenmesi ve bundan dolayı CD79b'nin ifadelenmesinin olmaması ya da düşük düzeyde olması

Kemik iliği incelemesi, KLL tanısı için gerekli değildir fakat sitopeninin nedeninin belirlenmesinde ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde çok yararlı olabilir (10,73,82). Atipik morfoloji gösteren KLL’de tanının desteklenmesini sağlayabilir. İnfiltrasyon tipi (yaygın ya da yaygın olmayan) hastalık seyrini önceden kestirmede kullanılan klasik işaretlerdendir (57).

2. Klinik

KLL hastalarının çoğu tanı anında asemptomatiktir ve genellikle rutin kan sayımları ile karşımıza çıkar (5,31). Buna karşın kimi olgularda, hücre topluluğunun kemik iliği ve periferik kanda birikmesinin yol açtığı etkiler sonucu belirtiler ortaya çıkar. Lenfadenopati, kilo kaybı, gece terlemesi, ateş yüksekliği gibi yakınmalar olabilir. Hastalar, aneminin neden olduğu yorgunluk ve fiziksel aktivitelerinin kısıtlanmasından yakınabilirler (31).

Hastaların en az % 60’ında hipogamaglobulinemiyle birlikte şiddetli ve tekrarlayıcı enfeksiyonlar bildirilmiştir (23). Enfeksiyonlar KLL ile ilgili ölümlerin en sık sebebidir (31).

Otoimmün olaylar KLL’de sık görülür ve sıklıkla kan hücrelerine karşıdır (34). Otoimmün hemolitik anemi olguların % 10-25’inde, immün trombositopeni hastaların % 2’ sinde görülürken nötrofillere karşı otoantikörler ve pure red cell aplazi nadir görülür (31).

3. Klinik Evreleme

Klinik evreleme sistemi, 1975’de Rai ve arkadaşları tarafından lenfadenopati, organ büyüklüğü (dalak ve karaciğer) ve sitopeniler temel alınarak geliştirilmiştir (60). Orijinal Rai evreleme sistemi daha sonra 5 gruplu sistemden (0-IV) 3 gruplu sisteme değiştirilmiştir. Hastalar düşük risk (orijinal Rai evre 0), orta risk (orijinal evre I-II) ve yüksek risk (orijinal evre III-IV) olarak gruplandırılmıştır (61).

KLL'nin evrelemesinde günümüzde 2 sistem kullanılmaktadır:

I) Modifiye Rai evrelemesinde KLL hastaları 3 gruba ayrılır (60,61) :

a) Düşük riskli hastalar: Sadece lenfositoz olması (evre 0)

b) Orta riskli hastalar: Lenfositozla birlikte lenfadenopatinin (evre I) ve / veya hepatosplenomegalinin olması (evre II)

c) Yüksek riskli hastalar: Lenfositozla birlikte üretim azalmasına bağlı anemi (evre III) ve / veya trombositopeninin bulunması (evre IV)

II) Binet evreleme sistemi lenfoid bölge sayısını, Hb ve Plt sayılarını temel alır (2):

a) Evre A: Hb düzeyi 10 gr/dl'nin üzerinde, Plt sayısı 100.000 mm³'ten fazla ve tutulan lenfoid bölgenin 2'den az olması

b) Evre B: Hb düzeyi 10 gr/dl'nin üzerinde, Plt sayısı 100.000 mm³'ten fazla ve tutulan lenfoid bölgenin 2'den daha fazla olması

c) Evre C: Tutulan bölge sayısından bağımsız olarak Hb düzeyinin 10 gr/dl'nin altında olması ve / veya Plt sayısının 100.000 mm³'ten az olması

4. Prognoz

KLL, son derece değişken klinik davranış biçimleri gösterir. Toplam sağkalım aylar ile sınırlı olabileceği gibi dekadlar ile ifade edilebilecek kadar uzun olabilir (5). KLL'de ortanca sağkalım yaklaşık olarak 7,5-10 yıldır (31,82).

Kimi hastalarda belirti yoktur ya da hastalıklarının seyri boyunca çok az belirti ve bulgular görülür (5). Diğer yandan kimi hastaların lenfosit sayıları hızla artar, organ büyüklüğü gelişir, hemogloblin ve platelet sayıları azalır, belirtiler artar ve tanıdan kısa bir süre sonra tedavi ihtiyacı duyarlar (5,31). Bu hastalarda yaşam beklentisi birkaç yıldır (31).

KLL’de, hastalığın biyolojik özellikleri ve klinik seyir, genç (<55 yaş) ve yaşlı hastalarda benzerdir. Her iki grupta da toplam yaşam beklentisi 10 yıl civarındadır, fakat iki grup arasında ölümün nedenleri farklıdır. Yaşlılar çoğunlukla KLL ile ilişkisiz nedenler ve ikincil tümörlerden ölürken genç hastalar KLL ile ilişkili nedenlerden kaybedilirler (31).

KLL’nin değişken klinik seyrinden dolayı hızlı seyredecek hastaları önceden belirlemek çok önemlidir. Bu nedenle KLL’de prognozu belirlemeye yardımcı çeşitli prognostik faktörler tanımlanmıştır.

4.1. Klinik Prognostik Faktörler

Geleneksel klinik prognostik faktörler 3 tanedir:

a) Rai veya Binet klinik evre: Rai ve arkadaşları, Rai evrelemesi ile sağkalım arasındaki ilişkiyi göstermişlerdir. Ortanca sağkalım; Evre 0’da 150 ay, evre I’de 101 ay, evre II’de 71 ay, evre III ve evre IV’de yaklaşık 19 aydır (60). Binet evrelemesine göre; Evre A’da sağ kalım yaş uyumlu kontrol grubundan farksız, evre B’de 84 ay, evre C’deyse 24 ay olarak saptanmıştır (2).

Klinik evreler, erken, orta ve ileri olarak sınıflandırıldığında; erken (Rai 0, Binet A), orta (Rai I/II, Binet B) ve ileri (Rai III/IV, Binet C) evrelerde yaşam süreleri sırayla >10 yıl, 5-7 yıl ve 1-3 yıldır (5).

Görüldüğü gibi Rai evre 0 ve Binet evre A diğer evrelerle karşılaştırıldığında daha iyi prognoza sahiptir (10). Bununla birlikte aynı grupta olup farklı klinik seyir gösteren hastalar da olması klinik evreleme sistemlerinin, erken evrede tanı konmuş KLL hastalarının hangilerinin daha sonra hızlı seyredeceğini ayırmada yetersiz olduğunu göstermektedir (5). Hastaların % 80’inden fazlasına erken evrede tanı konulması klinik evrenin prognozda kullanımını sınırlandırmaktadır (5,37).

b)Lenfosit katlanma süresi: LKS, mutlak lenfosit sayısının ikiye katlanma zamanının ay olarak belirlenmesiyle hesaplanır (75). Çoğalma hızını, basit metotla ölçen yararlı bir prognostik belirteçtir (50). NCI kılavuzunda, LKS'nin 6 aydan daha kısa olmasının tedavi endikasyonu olduğu belirtilmiştir (10).

Bir çalışmada, LKS 12 ay ya da daha kısa olan hastaların ortalama sağkalım süreleri 61 ayken, LKS 12 aydan uzun olan hastaların ortalama sağkalım süresine çalışma süresi içinde ulaşılmamıştır (ortalama takip süresi, 118 ay). Bu çalışma, klinik evre ve infiltrasyon tipiyle ilişkili olmasına karşın, LKS'nin bağımsız prognostik önemini göstermiştir (54).

Diğer çalışmalar da erken evre hastalarda, LKS'nin yararını desteklese de (50), klinik kullanımında önemli bir sorun vardır. LKS geriye dönük hesaplanır ve zamanla ilgili değişikliklerden tümüyle etkilenebilir (75). Enfeksiyonlar ya da kortikosteroid tedavisiyle lenfosit sayısının değişmesi, LKS'nin kullanımında güçlük yaratmaktadır (37). Tedavi kararında LKS'nin temel alınması hızlı seyirli kimi hastalarda tedavinin gecikmesine yol açabilir (48).

c)Kemik iliği infiltrasyon tipi: KLL 'de interstisyel, nodüler, karışık (interstisyel ve nodüler) ve yaygın olmak üzere 4 farklı kemik iliği infiltrasyon tipi tanımlanmıştır (71,73).

Bunlar:

1. Nodüler tip: Bazı alanlarda normal hematopoetik hücrelerin yerini nodüler lenfosit infiltratlar almasına karşın kemik iliğinin normal yapısı korunmuştur.
2. İnterstisyel tip: Lenfositik infiltratlar, hematopoetik hücreler ve yağ alanlarının arasında dağılmıştır. Kemik iliği mimarisi korunmuştur.
3. Karışık tip: Nodüler ve interstisyel tipin birlikteliğidir.
4. Yaygın tip: Yaygın lenfosit infiltrasyonu normal kemik iliği mimarisini silmiştir.

İnterstisyel, nodüler ve karışık tip sınırlı tutulum olarak gruplandırılmıştır (73). Yaygın infiltrasyon tipi kötü prognozla ilişkilidir (31). Sınırlı infiltrasyon tipine sahip KLL hastalarında sağkalım daha uzundur (70,71). Bu infiltrasyon tipleriyle, Rai klinik evresi arasında önemli ilişki mevcuttur (47). Benzer ilişki Binet evreleme sistemiyle de gösterilmiştir (71).

4.2. Serolojik Belirteçler

a) $\beta 2$ mikroglobulin: KLL hastalarında, hastalık evresi ve tümör yüküyle ilişkili bir serum belirteçidir. $\beta 2$ MG düzeylerinin kemoterapi yanıtı ve toplam sağkalım ile ters ilişkili olduğu gösterilmiştir (31). Tedavi almamış 302 hastada $\beta 2$ MG'in çok değişkenli analizde, 5 yıllık sağkalım üzerine güçlü belirleyici etkisi saptanmıştır. Beş yıllık sağkalım, yüksek $\beta 2$ MG olan Rai evre I-II hastalarda 54 ay, normal $\beta 2$ MG olanlarda 116 ay bulunmuştur (75). Buna karşın 106 tedavi almamış hastayla yapılan bir diğer çalışma, $\beta 2$ MG'in, çok değişkenli analizde tek başına sağkalım üzerine önemli bir belirleyici etkisi olmadığını göstermiştir (51).

$\beta 2$ MG'in, KLL'de prognostik önemi olsa da bu belirtecin evre ve LKS'nden bağımsız olduğunu gösterecek ve erken evre KLL hastalarındaki rolünü tanımlayacak ek çalışmalara ihtiyaç vardır (75).

b) Serum timidin kinaz aktivitesi: TK, DNA sentezinde rol alan hücresel enzimdir (75). Serum TK aktivitesi, muhtemelen neoplastik hücrelerin bölünme sayısı ile ilişkilidir. Tümör kitlesinin ve tümör hücrelerinin çoğalma derecesini yansıttığı düşünülmektedir (53).

Erken evre KLL hastalarında, prognozun değerlendirilmesinde yararlı olduğu bulunmuştur (33,48). Serum TK aktivitesi sağ kalım ile ters ilişkilidir (31,33). Rutin laboratuvarlarda çalışılmaması klinikte kullanımını sınırlamaktadır.

c) Serum LDH düzeyi: LDH, farklı genlerden kodlanan, 5 tetrametik izoenzimden oluşur (58). Tümör saldırganlığını ya da yüksek tümör yükünün tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır (4). LDH yüksekliğinin hücre çoğalmasını yansıttığı düşünülmektedir (58).

Yapılan bir çalışmada, normal B hücrelerindeki LDH aktivitesinin, B-KLL hücrelerine göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (62). 190 KLL'li hastada yapılan çalışmada LDH ile toplam sağkalım ve tedavisiz izlem süresi arasında önemli ilişki saptanmıştır (79).

d) Serum sCD23 düzeyi: CD23, B-KLL hücrelerinde yüzey molekülüdür. Yüksek serum düzeyleri, kötü prognoz belirteçidir (72). sCD23 düzeyi toplam sağkalım ve Binet evre A hastalarında hastalık ilerlemesiyle ters ilişkilidir (72). Bununla birlikte bağımsız prognostik önemi kanıtlanmamıştır (53).

4.3.Yeni Biyolojik Faktörler

1) İmmünglobulin ağır zincir gen mutasyon durumu: Normal B hücre olgunlaşması, germinal merkez içerisinde antijenle karşılaştıktan sonra oluşan ağır zincir genlerinin somatik mutasyonunu içermektedir (41). KLL, pregerminal merkezde Ig mutasyonu olmayan B hücreleri ve germinal merkezden geçerken Ig mutasyonu oluşan B hücreleri olarak iki farklı formdan oluşur (69).

Lösemik hücrelerin immünglobulin ağır zincir değişken gen bölgesinin somatik hipermutasyonu, KLL hastalarının % 50 ila % 70'inde gösterilmiştir (26). Erken evredeki hastalarda, klinik evreden ve sitogenetik anormalliklerden bağımsız olması, IgVH mutasyon durumunun prognostik önemini göstermektedir (3).

KLL hastalarında sağkalımın, IgVH mutasyon durumuyla ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Sağkalım avantajı erken evre hastalarda da gösterilmiştir. KLL'de, geriye dönük çalışmalarda,

IgVH mutasyonu daha iyi prognoz ile ilişkili bulunmuştur. Mutasyonsuz KLL’de ortalama sağkalım 79-119 ay, mutasyonlu KLL’de 293 aydır. IgVH mutasyonu olmayan hastalarda IgVH mutasyonu olan hastalara göre ilerleyici hastalık, atipik lenfosit morfolojisi, olumsuz sitogenetik özellikler ve tedaviye direnç daha fazladır (16,35,43).

Bununla beraber IgVH mutasyonunun analizi, karmaşık, pahalı ve çalışma süresi uzundur (35,75). Bu nedenle rutin tanısal laboratuvar testi olarak kullanılması uygun değildir (38) .

2) CD38 ifadenmesi: CD38, 1980 yılında T hücre farklılaşma antijeni olarak tanımlanmıştır (66). Takip eden yıllarda birkaç çalışmada CD38 ifadenmesinin, T hücreleri ile sınırlı olmadığı ve farklı hematopoetik ve nonhematopoetik dokularda büyük oranda ifadelendiği gösterilmiştir (18,42). Hematopoetik hücrelerde CD38 ifadenmesi, bu hücrelerin olgunlaşma ve aktivasyon evreleriyle ilişkilidir. CD38, CD34 pozitif progenitor hücrelerde, uyarılmamış pregerminal merkez B hücrelerde, germinal merkez B hücrelerde, aktive olgun lenfositlerde, plazma hücrelerinde ve myeloid prekürsörlerde ifadenir (40). B hücrelerde CD38’in fonksiyonu kesin olarak tanımlanmamıştır (30). KLL’li olgularda CD38 ifadenmesi farklıdır ve prognostik değeri vardır (16,40).

CD38’in yüksek oranda ifadenmesi, ileri evre hastalık ve kemoterapiye kötü yanıtla ilişkilidir (19). CD38 ifadenmesi yüksek olan hastalarda, neoplastik hücrelerde atipik morfoloji, yaygın kemik iliği infiltrasyonu ve periferik lenfosit sayısında yükseklik daha sık gözlenir (40). Bu hastaların sağkalım süreleri daha kısadır (19,31,40,79). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada CD38 pozitif olan KLL hastalarında, negatif olanlara göre tedavisiz izlem süresinin daha kısa olduğu gösterilmiştir (79).

Günümüzdeki farklı çalışmalarda CD38 ifadenmesinde eşik değeri konusu tartışmalıdır (31). Bazı çalışmalarda eşik değer olarak % 30’un kullanılması önerilmiştir (36). Sonraki

çalışmalarda % 7 (43), % 5 (37) gibi eşik değerlerin de prognozda önemli olduğu bildirilmiştir. CD38 ifadenmesinin zaman içerisinde değişebileceği rapor edilse (36,43,53) de yakın zamanda yapılan bir çalışmada, 6 yıllık bir dönemde CD38 düzeyinin değişmediği gösterilmiştir (79). CD38'in bağımsız bir prognostik faktör olduğu düşünülmektedir (36).

3) KLL hücrelerinde ZAP-70 ifadenmesi: Lösemik hücrelerde ZAP 70 ifadenmesinin % 20'den fazla olması kötü prognostik özelliktir (13,25,36,56,63). Bu konu ile ilgili ayrıntılı bilgi ileride verilmiştir.

4) Kromozom anormallikleri: Kromozomal anormalliklerinin tanınmasıyla KLL hastalarının farklı prognoza sahip altgrupları belirlenebilmiştir (24).

KLL'de konvansiyonel bantlama teknikleri, neoplastik hücrelerde düşük mitotik indeks olması ve metafaz kalitesinin suboptimal olmasından dolayı zordur (24,53). FISH, metafaz ve interfaz hücrelerinin her ikisinde de özgün kromozomal anormallikleri saptamaya olanak sağlar (32). Konvansiyonel sitogenetik çalışmalar ile KLL hastalarının % 30-40'ında sitogenetik anormallikler gösterilirken FISH'da çoklu prob kullanılarak bu oran % 80'e ulaşmaktadır (32). Konvansiyonel sitogenetik yöntemlerle en sık trizomi 12 ve 13q14 ve 14q32 kromozomal anormallikleri saptanır. FISH ile en sık 13q delesyonu saptanmaktadır (24).

Döhner ve ark. yaptığı çalışmada, 13q delesyonu, 11q delesyonu, trizomi 12, 17p delesyonu, 6q delesyonu, trizomi 8, 14q32 translokasyonu ve trizomi 3 anormallikleri FISH'le olguların % 82'sinde gösterilmiştir. Bu çalışmada, 13q delesyonu % 55, trizomi 12q % 14, 11q delesyonu % 17, 17p delesyonu % 7, diğer anormallikler % 8, gösterilemeyen lezyonlar % 18 olarak bulunmuştur. 17p ve 11q delesyonunda klinik gidiş kötü ve sağkalım süresi kısa,

tek 13q delesyonunda ise sağkalım uzundur. Trizomi 3, 6q delesyonu, trizomi 8 ve 14g32 translokasyonunun bulunduğu hastaların ortalanca sağkalım sürelerine çalışma içinde ulaşılamamıştır (24).

17p delesyonu

17p delesyonu, KLL olgularında % 7-12 oranında görülür (24,49). 17p13 bölgesinde bulunan p53 tümör baskılayıcı gen programlı hücre ölümünün düzenlenmesinde anahtar moleküldür (49,77).

Yapılan bir çalışmada 17p delesyonunun yaş ile ilişkili olduğu ve yaşlı KLL hastalarında daha sıklıkla görüldüğü rapor edilmiştir (67). KLL’de, 17p13 kromozom bölgesinin delesyonunda prognoz kötüdür. Hastalık ilerlemesinin 1-2 yıl içerisinde olacağını gösterir ve göreceli olarak kemoterapi direnci söz konusudur (43). 17p delesyonu, hastalıkla ilişkili ölümün güçlü bağımsız bir belirleyicisidir ve bu hastalarda ortalanca sağkalım 32 aydır (24). Aynı zamanda 17p delesyonu kısa tedavisiz izlem süresiyle de ilişkilidir (32).

11q22-23 delesyonu

Bu delesyon, tüm KLL hastalarının % 12-21’inde rapor edilmiştir (24). Kromozom 11’in uzun kolunda bulunan q22-23 bölgesinin delesyonunda, prognoz kötüdür. Delesyon ATM bölgesini içermektedir. Bu genin nörolojik rahatsızlık ve tümör oluşum riskinin artması ile karakterli hereditör bir sendrom olan ataksi telanjektaziden sorumlu olduğu bilinmektedir. ATM’nin apoptozis yolunda önemli sinerjistik etkisi bilinmektedir ve yetmezliği durumunda KLL dışı lenfoproliferatif rahatsızlıkları da içeren bazı malinitelerin sıklığının arttığı görülmüştür (49). Normal ATM, p53 ile ilişkili apoptotik yolun aktivasyonunda baskın rol oynar (77) ve kaybında p53 eksikliğine benzer sonuçlar görülür (49).

11q delesyonu daha çok genç olgularda görülür. Bu delesyonun büyük lenf bezleri ilişkili olduğu gösterilmiştir. 11q delesyonunun olduğu hastalarda ortalanca sağkalım süresi 79 aydır (24).

Trizomi 12

Yetersiz kalitedeki karyogramlarda bile kolaylıkla tanınır (49). FISH çalışmalarında yaklaşık % 15-18 oranında rapor edilmiştir. Trizomi 12 sıklıkla diğer karyotip anormallikleri ile birlikte (49). Trizomi 12, lösemik hücrelerde atipik morfolojiyle ilişkili olup hastalarda 6q delesyonu daha sıklıkla gözlenir ve lenfositleri plazmasitoid özellik sergiler. Trizomi 12'nin prognozu ortadır ve sağkalım süresi ortalanca 114 aydır (24).

13q delesyonu

KLL'de 13q14 delesyonu çok sıktır, olguların % 40-65'inde rapor edilmiştir. 13q delesyonu olasılıkla tek bölge (q14) ile sınırlıdır ya da kromozom 13'ün uzun kolundaki büyük interstisiyel bölgenin kaybı buna eşlik eder. Olguların yaklaşık olarak üçte birinde her iki allel delesyonu birden görülür (49). Sadece 13q delesyonu varsa prognoz iyidir (41,43). 13q delesyonunda ortalanca sağkalım ortalama 133 aydır (24). Takipte başka kromozomal anormallikler oluşursa 13q14 delesyonunun olumlu etkisi ortadan kalkar (49).

Daha az sıklıkla görülen kromozomal anormallikleri

KLL olgularının % 2-6'sında görülen (49) 6q delesyonu (çoğunlukla 6q21-23) diğer lenfatik malinitelerde de görülebilir (15). 6q delesyonu olan olgularda, prognoz ortadır (15).

Trizomi 8, 14q32 translokasyonu ve trizomi 3 anormallikleri de tanımlanmıştır (24,49). Bu anormalliklerde sağkalım daha iyidir (24).

KLL’de normal karyotip

KLL olgularının % 20-40’ında, gelişmiş sitogenetik teknolojilerin kullanılmasına rağmen genetik bozukluk gösterilemez. Döhner ve ark. çalışmasında, olguların % 18’inde FISH’le sitogenetik anormallik gösterilememiştir (24). Sitogenetik bozukluğun olmaması iyi klinik prognozla kendini gösterir (24,49). Bu hastalarda sağ kalım süresi 111 aydır (24).

4.4.Diğer Prognostik Faktörler

KLL’de bazı sitokin, enzim ve moleküler belirteçlerin de prognostik faktör olabileceği düşünülmektedir (75). Bunlar arasında IL-6 (27,45), IL-10 (27), TNF- α (28), intraselüler Bcl-2 (68) ve ICAM1 (12) bulunmaktadır. Ayrıca KLL’de sağkalım ile vasküler faktörler arasında ilişki gözlenmiştir (75). VEGF, tümör anjiogenezisinde önemli bir araçtır. Binet evre A ya da Rai evre I-II olup serum VEGF düzeyi ortanca değerin üzerinde olan hastalarda, ilerlemesiz sağkalım önemli derecede kısa saptanmıştır (52).

II. ZAP-70

ZAP-70, 70 kDa ağırlığında bir proteindir ve 2. kromozomun 2q2 bölgesinde kodlanır (1). Syk-ZAP-70 tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir ve T hücre reseptöründen sinyal iletimiyle ilişkilidir (7,8,46). ZAP-70'in KLL'de, B hücre reseptör sinyali ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (9,78).

ZAP-70, 619 aminoasit uzunluğundaki 3 zincirden oluşur. Tirozin kinaz alanları, SH adında 3 ana alan içerir. SH1 bölgesi enzimatik aktivite içerir, SH2 özellikle protein-protein etkileşimini ve özgün olarak fosfotirozinleri tanıyarak fosforilasyonu kontrol eder ve SH3, protein etkileşimleri için daha özgün tanınmaları sağlar. ZAP-70'in N terminalinin sonunda iki SH2 bölgesi, karboksi terminalindeyse katalitik bölgeler bulunur. ZAP-70'in SH2 bölgesi ve syk immün reseptörler üzerinde bulunan ITAM olarak adlandırılan immünreseptör tirozin tabanlı aktivasyon motiflerini özgün olarak tanır (1).

Periferal kanda, NK ve T hücrelerinde ZAP-70 ifadenmesi yüksek olarak görülürken B hücrelerinde ifadenme yoktur (3,7,8,46). Son zamanlardaki çalışmalarda aktive tonsil ve dalak B hücreleri ve kemik iliği pro-B hücreleri gibi kimi B hücre alt gruplarında, ZAP-70 ifadenmesinin olduğu gösterilmiştir (14,55). Periferik kana göre kemik iliğindeki B-KLL hücrelerinde ZAP-70 ifadenme düzeyi daha yüksektir (76).

Chen ve arkadaşları, ZAP-70 ifadenmesinin KLL hücrelerinde BCR aracılı sinyal iletimini artırdığını ileri sürmüşlerdir (9). İntraselüler sinyalin artması KLL hücrelerinde sağkalımı ve çoğalmayı etkileyebilir (21).

ZAP-70 ifadenmesi, Western blot, kantitatif RT-PCR, immünohistokimyasal olarak ve akım sitometri gibi farklı yöntemlerle ölçülebilir (1,13). Akım sitometri hematolojik malinitelerin tanısında kullanılan kesin ve hızlı bir yöntemdir (3). Akım sitometriyle KLL

hücrelerinde, T hücrelerinde ve NK hücre gruplarında, ZAP-70 pozitif hücre yüzdesi analiz edilebilir (13). Karşıt olarak, Western blot ve RT-PCR’da, örneklerde T hücreleri de bulunduğu için ZAP-70 ifadenmesi olduğundan daha yüksek bir değerde saptanır (9,69). Rassenti ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, akım sitometri ve immün blot yöntemiyle analiz edilen ZAP-70 ifadenme düzeyleri ilişkili bulunmuştur (63). Akım sitometri ile RT-PCR yönteminin, 28 hasta üzerinde karşılaştırıldığı başka bir çalışmada da sonuçlar ilişkili bulunmuştur (25).

Lösemik hücrelerde, ZAP 70 ifadenmesinin % 20’den fazla olması kötü prognostik özelliktir. ZAP-70 ifadenmesi, B-KLL ‘de hastalık ilerlemesi ve toplam sağkalımın önemli bir belirleyicisi olarak tanımlanmıştır (13,25,36,56,63). Bir çalışmada ZAP-70 negatif olan KLL’li hastaların ortalama yaşam süreleri 24,4 yılken ZAP-70 pozitif olan hastaların ortalama yaşam süreleri 9,3 yıl olarak saptanmıştır (56). Yapılan bir çalışmada ilerlemesiz sağkalım üzerine ZAP-70, sCD23 ve modifiye Rai evresinin bağımsız prognostik faktör olduğu saptanmış, toplam sağkalım açısından sadece ZAP-70’in bağımsız belirleyici bir faktör olduğu rapor edilmiştir (21).

ZAP-70 ifadenmesiyle ağır zincir gen mutasyon durumu arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır (13,63). IgVH mutasyon durumunun belirlenmesi zor ve zaman alıcı olduğu için bunun yerine ZAP-70’in kullanılabileceği belirtilmektedir (13).

ZAP-70 ifadenmesi, tedavi gereksiniminin erken bir belirleyicisi olduğu gibi bazı çalışmalarda tedavi yanıtında da rolü olduğu gösterilmiştir. ZAP-70 negatif grupta, fludarabin kemoterapisiyle tam yanıt oranı, ZAP-70 pozitif gruba göre anlamlı olarak fazla bulunmuştur (21). Kimi çalışmalarda, ZAP-70 pozitif hastaların ZAP-70 negatif gruptaki hastalara göre daha yoğun kemoterapi gereksinimi olduğu rapor edilmiştir (25,39).

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalar

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Polikliniği'ne başvurmuş ve KLL tanısı konmuş olan 52 hasta çalışmaya alındı. Bunların 31'i erkekti; erkek / kadın oranı 1,4 / 1 ve ortalama yaş 61,5'du (yaş aralığı 40-78) (Tablo I).

NCI-WG ölçütlerine göre aşağıdaki durumların varlığında hastalara KLL tanısı kondu:

1. Periferik kanda 1 aydan uzun süredir $5 \times 10^9 / L$ 'den fazla olgun görünümlü lenfosit olması
2. Akım sitometri ile aşağıdaki özelliklerin saptanması
 - a. B lenfositlerde sadece kappa veya lambda ifadenmesi
 - b. CD19 + CD5'le birlikte CD23 ifadenmesi
 - c. Yüzey Ig'nin düşük derecede ifadenmesi ve bundan dolayı CD79b'nin ifadenmesinin olmaması ya da düşük düzeyde olması

Tanı anında beyaz küre sayısı, lenfosit yüzdesi, hemoglobin düzeyi, platelet sayısı ve serum LDH ölçümleri yapıldı. Rai ve modifiye Rai evrelemesine göre klinik evre tespit edildi. Bir hastanın tanı anındaki tam kan sayımı sonucuna, dört hastanın ise serum LDH düzeyi ölçümüne ulaşılamadı. Kemik iliği biyopsisi yapılmış olan 37 hastanın kemik iliği infiltrasyon tipleri not edildi. 52 hastanın 44'ünün CD38 düzeyine ve 47'sinin FISH sonuçlarına ulaşıldı. Tüm hastaların ZAP-70 ifadenme düzeyleri akım sitometrik yöntemle analiz edildi.

Akım Sitometrik Ölçümler

ZAP-70 İfadenmesinin Saptanması

52 KLL hastasından alınan kan örneklerindeki mononükleer hücreler, permeabilizasyon sıvısı (BD Biosciences) kullanılarak 5-7 dakika tespit ve permeabilize edildi. Üzerine 1,5

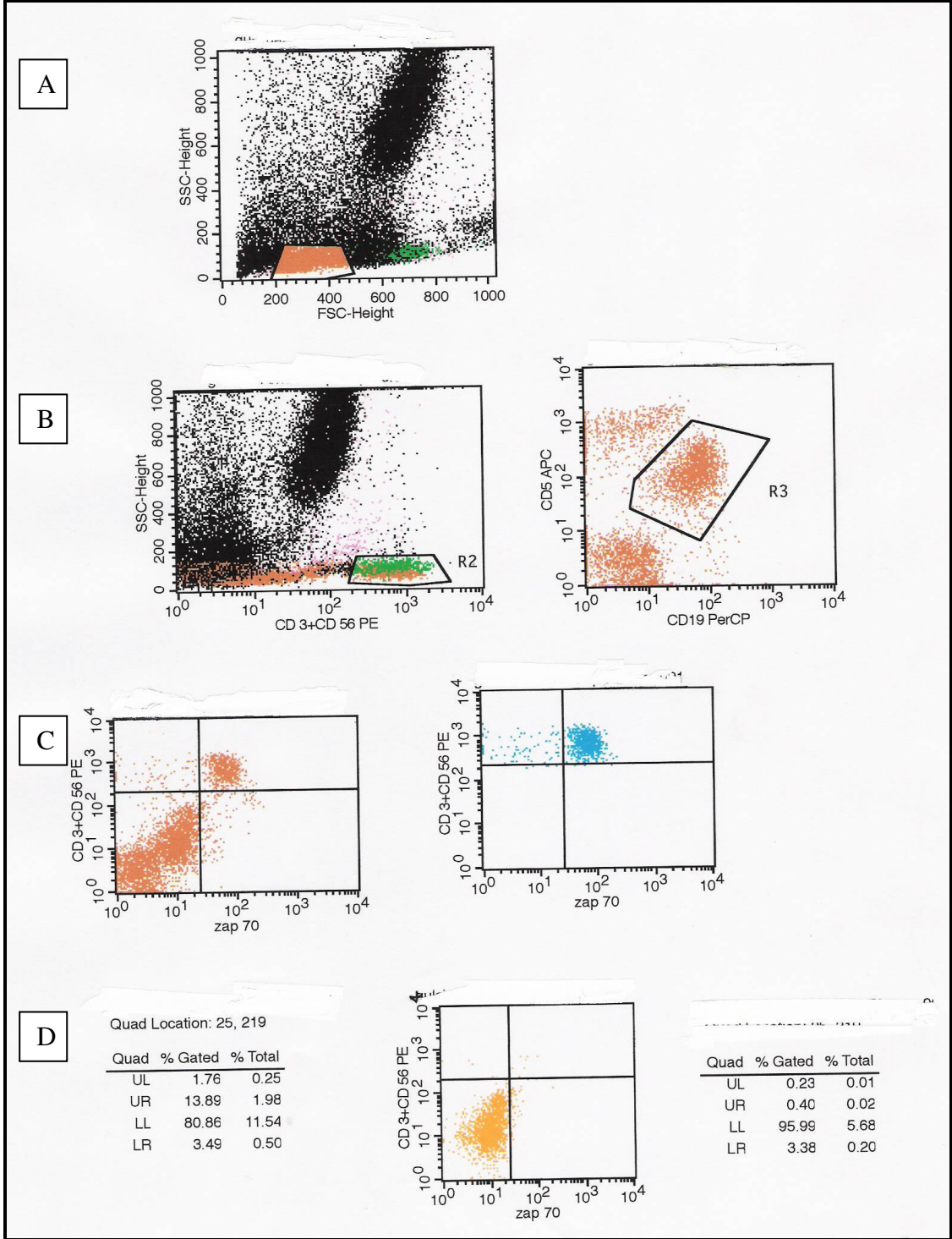
mililitre hücre yıkama sıvısı eklenip 1200 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra her 500,000 hücreye 1,5 µg anti- ZAP-70 antikoru (Caltag) eklenip oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildikten sonra fosfat- tamponlu tuz sıvısında bir kez yıkandı. 4 mikrogram keçi kaynaklı anti immünglobulin floreseyn isotiyosiyanat (BD Biosciences) ile 20 dakika inkübe edildi, bir kez hücre yıkama sıvısı ile yıkandı, daha sonra 5 mikrolitre normal fare serumu (eBioscience) ile 5 dakika inkübe edildi. Son olarak CD3-phycoerythrin, CD56-phycoerythrin, CD19-peridinin chlorophyll protein cychrome 5,5 ve CD-5 allophycocyanine (BD Biosciences) eklendi ve örnekler 15 dakika inkübe edildi.

Örnekler 2 floresan detektörde her bir örnekte en az 1000 T ve NK hücresi olacak şekilde akım sitometri cihazı (FACS Calibur, BD Biosciences) ile analiz edildi. Örneklerin analizi CellQuest software (BD Biosciences) kullanılarak yapıldı.

Lenfositler, debris inklüzyonlarından, monositlerden ve doubletlerden uzak tutuldu. Sonuçta ortaya çıkan hücreler CD3+ CD56+ hücrelerin (T ve NK hücreler) seçilip ayrılmasından sonraki kalan hücrelerdir. Biparametrik noktalı grafiklerde ZAP-70 ve CD3+CD56 boyanan hücreler, T hücreleri, NK hücreleri ve KLL hücrelerinden bağımsız olarak yerlerini alırlar. T ve NK hücrelerini içeren markerın (her bir grafikte sağ üst bölümde) kullanımı ile ZAP-70 pozitif KLL hücrelerinin yüzdesi hesaplanır (Şekil 1, Şekil 2).

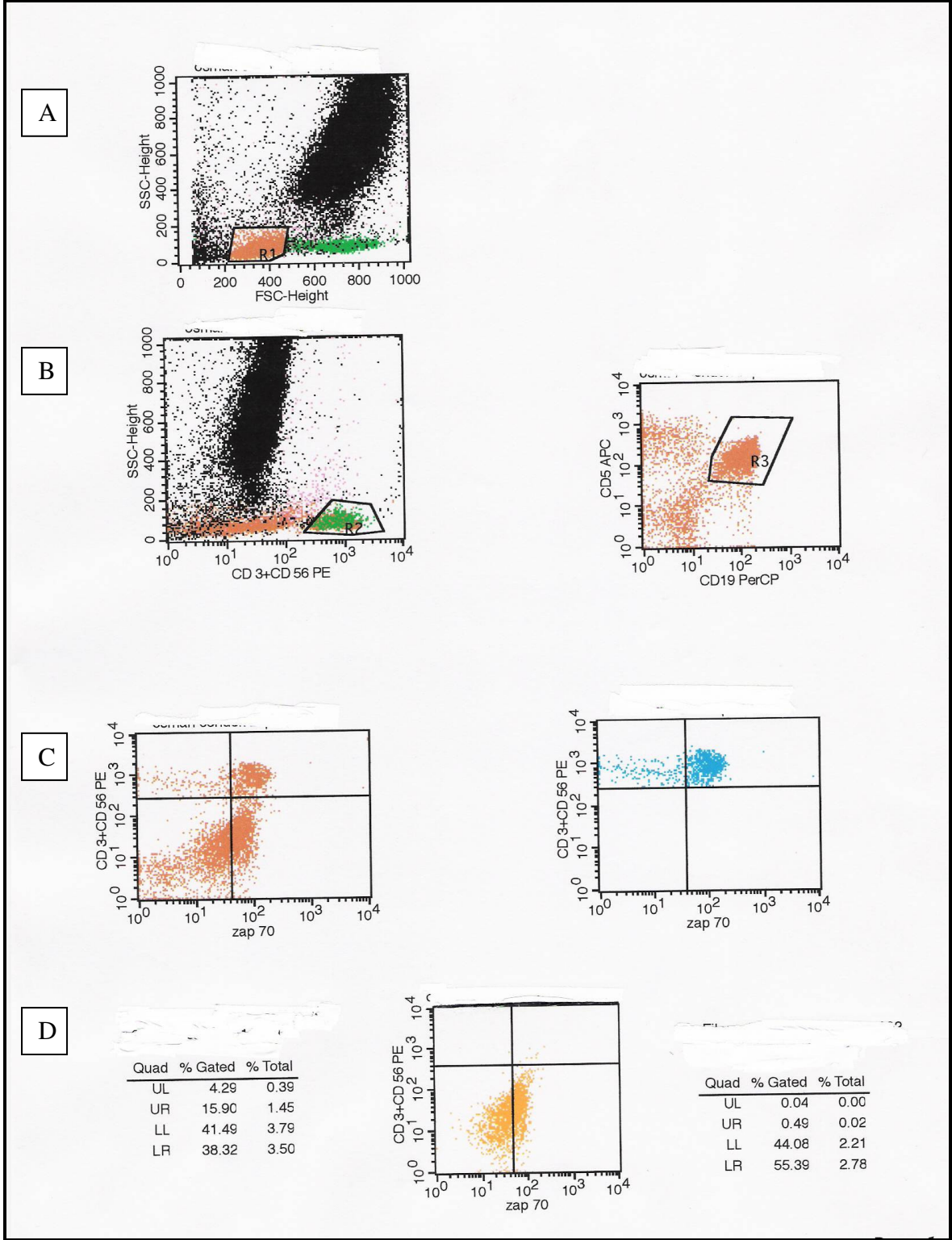
Şekil 1 ve 2’de A bölümündeki grafikte R1 bölgesi olarak gösterilen hedef hücre grubu lenfositlerden oluşmaktadır. B bölümündeki grafiklerde, R2 bölgesi NK ve T hücrelerini (CD3+ CD56+), R3 bölgesi KLL hücrelerini (CD19+ CD5+) hedef almaktadır. C bölümünde sağ üst kadranda, CD3+ CD56+ ve ZAP-70 pozitif hücre grubu (ZAP-70 için pozitif iç kontrol grubu) bulunmaktadır. D bölümünde şekil 1’de sol alt kadranda, ZAP-70 negatif KLL hücreleri, şekil 2’de sağ alt kadranda ZAP-70 pozitif KLL hücreleri görülmektedir.

Hastalar, lösemik hücrelerde % 20 ya da üzerinde ZAP-70 ifadelenmesi olması durumunda ZAP-70 açısından pozitif kabul edildi.



Şekil 1. Akım sitometrik yöntemle ZAP-70 ifadelenmesi

ZAP-70 negatif KLL'li hasta örneği



Şekil 2. Akım sitometrik yöntemle ZAP-70 ifadenmesi

ZAP-70 pozitif KLL'li hasta örneği

CD 38 İfadelenmesinin Saptanması

100 mikrolitre örneğe 10'ar mikrolitre CD5, CD19 ve CD38 antikoru (BD Biosciences) eklendi ve karıştırıldıktan sonra 15-30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. 1.5 ml lysis solüsyonu (BD Biosciences) eklenerek 5-8 dakika karanlıkta inkübe edildi. 1200 devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra hücre yıkama sıvısı ile yıkandı. Daha sonra 500 mikrolitre hücre yıkama sıvısı eklendi ve akım sitometri cihazında okutuldu.

CD38 ifadelenmesinde eşik değeri olarak %30 kullanıldı. CD38 ifadelenmesi % 30' un üzerinde olması durumunda CD38 açısından pozitif kabul edildi.

FISH ile Sitogenetik Analiz

KLL hastalarından alınan periferik kan örnekleri, 37⁰C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 1:1 oranında izotonik solüsyonla karıştırılıp üzerine 5 ml fikol konuldu ve 1800 devirde 30 dk santrifüj edildi. Ara bulutsu faz alındıktan sonra 1:1 izotonik solüsyonla karıştırılıp 1800 devirde 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra RPMI1640 100 ml, fetal sıgır serumu (FBS) 12 ml, L-glutamin 1,15 ml, penisilin 1 ml, streptomisin 1,2 ml, phytohemagglütinin 672 µl eklenip 24 saat inkübe edildi. Daha sonra 2 damla kolşisin ile inkübe edildi ve 1200 devirde 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra kalan kısma hipotonik solüsyon (5 ml KCl) eklenerek 37⁰C'de inkübe edildi ve 2 ml fiksatif (3:1 oranında metanol ve asetik asit) konulduktan sonra 1200 devirde 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılıp 2 ml fiksatif eklendikten sonra 4⁰C'de 30 dk bekletildi ve 1200 devirde 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra 2 ml daha fiksatif eklendi ve -20⁰C'de bekletildi. Her bir örnekten, lamlara damlatıldı kuruduktan sonra metanolde 5 dk bekletildi. Daha sonra her lam üzerine 10 µl prob karışımından (7 µl hibridizasyon tamponu, 2 µl distile su, 1 µl prob) eklendi. Lameller hiç hava almayacak şekilde lamaların üzerine

yapıştırıldıktan sonra hibridizasyon cihazında (HyBrite, Vysis) 16 saat inkübasyona bırakıldı. Lamlar, yapışkanları temizlendikten sonra 25⁰C’de olan 1x standart tuzlu sitrat (SSC) (76 ml distile su, 4 ml SSC) (Vysis) içerisine kondu daha sonra lameller çıkarıldı ve lamlar 71⁰C’de olan 1xSSC içerisine 25 sn kalacak şekilde kondu. Kuruyan lamların üzerine 10 µl DAPI (Abbott Vysis) kondu, daha sonra lamel yapıştırılarak +4⁰C’ye kaldırıldı.

Lokusa özgü problar (p53/turuncu spektrum, ATM/yeşil spektrum, LSI 13S319/Turuncu spektrum) kullanılarak interfaz nükleusta genetik bölgelerin kaybı belirlendi. Trizomi 12 spektrum yeşil ile etiketlenen probta sentromer sayımı yapılarak tespit edildi. Preparatlar, Nikon floresan mikroskobu kullanılarak incelendi ve 100 interfaz nükleus sayıldı.

10 normal kişinin çevre kan örnekleri, p53 (17p13.1), LSI ATM (11q22.3), CEP 12 ve LSI D13S319’dan (13q14.3) (Vysis, Downers Grove, IL) oluşan KLL FISH araştırma paneli için kontrol grubu olarak kullanıldı.

Kontrol grubuna göre değerlendirme sonucunda referans değer olarak, 11q ve 17p delesyonu için % 5, trizomi 12 ve 13q delesyonu için % 1 alındı.

İSTATİKSEL ANALİZ

Bu çalışmada elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS.13 paket programı kullanıldı. ZAP-70 ile diğer değişkenler arasındaki karşılaştırmalar, Mann-whitney U ve Fischer Exact ki-kare testi ile değerlendirildi. Korelasyon analizleri, Pearson testi kullanılarak yapıldı. Tedavisiz izlem süreleri, log-rank testi kullanılarak Kaplan-Meier analizi ile değerlendirildi. ZAP-70 ve diğer değişkenlerin çok değişkenli analizi, lojistik regresyon modeli kullanılarak yapıldı. Anlamlılık seviyesi olarak 0,05 alınmış olup, p değerinin <0,05 olması durumunda farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtildi.

BULGULAR

Toplam 52 KLL hastası çalışmaya alındı. Hastaların ortalama izlem süresi 39,5 (1-220) aydı. 52 hastanın 14'ünün (% 26,9) tedavi gereksinimi oldu. Bu hastaların tanı-tedavi süresi 0-71 ay arasında değişmekteydi. 52 hastanın 32'sinde (% 61,5) ZAP-70 ifadenmesi % 20'nin altındayken, 20'sinde (% 38,5) ZAP-70 ifadenmesi % 20'nin üzerindeydi (Tablo I).

Tablo I. Hastaların klinik özellikleri

Yaş (y) (ortanca)	61,5 (40-78)
Cinsiyet	
Erkek	31
Kadın	21
Beyaz Küre Sayısı / μ l (ortanca)	25.400 (5.930 - 460.000)
Lenfosit % (ortanca)	78 (40 – 98)
Hemoglobin g/dl (ortanca)	13,6 (6,3 - 17,7)
Platelet $\times 10^3$ / μ l (ortanca)	195.000 (59,400 - 341.000)
Rai Evresi	
0	25
I	16
II	9
III	1
IV	1
Modifiye Rai Evresi	
Düşük riskli	25
Orta riskli	25
Yüksek riskli	2
LDH	
Normal	39
Yüksek	9
ZAP-70 ifadenmesi % (ortanca)	
Negatif	9,95 (0,62-19,8)
Pozitif	44,05 (21-74)

ZAP-70 pozitif olan 20 hastanın 11'i (% 55) erkekken, ZAP-70 negatif olan 32 hastanın 20'si (% 62,5) erkekti. İki grup arasında cinsiyet ve yaş açısından anlamlı farklılık gözlenmedi ($p > 0,05$).

ZAP-70 pozitif 19 hastanın 4'ünde (% 21,1), ZAP-70 negatif 31 hastanın 4'ünde (% 12,9), LDH yüksek saptandı. ZAP-70 pozitif ve negatif gruplar arasında LDH düzeyi açısından anlamlı farklılık gözlenmedi. ZAP-70 pozitif ve negatif gruplar arasında BK sayısı, lenfosit yüzdesi ve platelet sayısı açısından anlamlı farklılık saptanmadı. Hb düzeyi, ZAP-70 pozitif hastalarda, ZAP-70 negatif hastalara göre anlamlı derecede düşüktü (Tablo II).

Hb düzeyi ile ZAP-70 ifaedelenmesi arasında ters ilişki saptandı. ($r = 0,32$, $p = 0,02$)

Tablo II. ZAP-70 pozitif / negatif grupların kan sayımı, LDH, LKS, Rai evre ve kemik iliği infiltrasyon tipine göre dağılımı

	ZAP-70 pozitif n= 20	ZAP-70 negatif n= 32	p
BK	28.500 (5.930-46.000)	25.000 (12.600-238300)	= 0,46
Lenfosit	80 (40-98)	74 (51-97)	= 0,29
Hb	12,4 (6,3-17,7)	14,2 (9,9-16,6)	= 0,02
Plt	178.000 (90.000-297.000)	221.500 (59.400-341.000)	= 0,07
LDH	206 (157-355)	187 (150-418)	= 0,31
LKS <12 ay	% 55,6	% 17,2	= 0,04
Rai evre III-IV	% 10	% 0	= 0,02
Yaygın inf. tipi	% 66,7	% 36,4	= 0,10

ZAP-70 ve Klinik Evre İlişkisi

52 hastanın 50'sinde (% 96,15) Rai evresi 0, I ya da II idi. Geriye kalan 2 (% 3,85) hastadan biri Rai evre III, diğeri Rai evre IV 'dü. Evre III ve IV olan 2 hastanın da ZAP-70 ifadelenmesi % 20'nin üzerindeydi. ZAP-70 pozitif ve negatif gruplar arasında, Rai evre III ve IV açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (Tablo II). Modifiye Rai evrelemesine göre, ZAP-70 negatif grupta, 19 hasta (% 59,4) düşük riskliken (Rai evre 0) ZAP-70 pozitif grupta sadece 6 hasta (% 30) düşük riskliydi. Rai evrelemesi ile ZAP-70 ifadelenmesi arasında pozitif ilişki saptandı ($r=0,41$, $p=0,002$).

ZAP-70 ve Lenfosit Katlanma Süresi İlişkisi

ZAP-70'i pozitif olan 9 hastanın 5'inde (% 55,6), ZAP-70'i negatif olan 29 hastanın 5'inde (% 17,2) LKS 12 aydan kısaydı. ZAP-70 pozitif ve negatif gruplar arasında LKS açısından anlamlı istatistiksel fark saptandı ($p=0,04$) (Tablo II).

ZAP-70 ve Kemik İliği İnfiltrasyon Tipi İlişkisi

ZAP-70'i pozitif olan 15 hastanın 10'unda (% 66,7), ZAP-70'in negatif olan 22 hastanın 8'inde (% 36,4) kemik iliği infiltrasyonu yaygın tipti. ZAP-70 pozitif ve negatif gruplar arasında kemik iliği infiltrasyon tipi açısından anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo II).

ZAP-70 ve CD38 İlişkisi

ZAP-70 pozitif ve negatif gruplar arasında, CD38 (>30) açısından anlamlı fark saptanmadı (Tablo III).

44 hastanın 23'ünde (% 52,3) ZAP-70 ve CD38 ifadelenmesi negatif bulundu. Altı hastada (% 13,6) her ikisi de pozitifdi. 15 hastada ZAP-70 ve CD38 ifadelenmesi uyumsuzdu.

Bu hastaların 12'sinde (% 27,3) ZAP-70 pozitif / CD38 negatif, 3'ünde (% 6,8) ZAP-70 negatif / CD38 pozitifdi.

CD38 için eşik değer olarak % 20'yi kullandığımızda, 14 hastada (% 31,8) CD38 pozitif, 30 hastada (% 68,2) CD38 negatif bulundu. ZAP-70 pozitif 18 hastanın 9'unda (% 50), ZAP-70 negatif 26 hastanın 5'inde (% 35,7) CD38 ifadenmesi % 20'nin üzerindeydi. CD38 ifadenmesinde eşik değer olarak % 20 kullandığımızda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptadık ($p < 0,05$).

CD38 pozitif ve negatif olan hastalar arasında tedavi gereksinimi açısından fark saptamadık.

ZAP-70'i negatif ve CD38 ifadenmesi % 30'un altında olan 23 hastanın 2'sinde (% 8,7) (ortanca takip süresi 40 ay) tedavi gereksinimi olurken ZAP-70 ve CD38 ifadenmesi pozitif olan gruptaki 6 hastanın 3'ünün (ortanca takip süresi 25 ay) tedavi gereksinimi oldu.

ZAP-70 ve FISH İlişkisi

Toplam 47 hasta, 11q delesyonu, 13q delesyonu, 17p delesyonu ve trizomi 12 açısından FISH ile değerlendirildi. FISH anormalliği saptanan hastalarda her bir anormallik için ortanca değer; 11q delesyonu olanlarda % 36 (9-77), 13q delesyonu olanlarda % 32 (2-93), 17p delesyonu olanlarda % 11 (6-25), trizomi 12'de % 38,5 (5-73) olarak bulundu. 23 hastada FISH'le bir sitogenetik anormallik, 10 hastada iki sitogenetik anormallik, 3 hastada üç sitogenetik anormallik ve 1 hastada dört sitogenetik anormallik saptandı. 10 hastadaysa (% 21,3) FISH'le hiçbir anormallik tespit edilmedi.

47 hastanın 31'inde (% 65,9) 13q delesyonu saptandı. 47 hastanın 18'inde (% 38,3) 13q delesyonu tek sitogenetik anormallikti. ZAP-70 pozitif ve negatif gruplar arasında 13q delesyonu, 11q delesyonu, p53 delesyonu ve trizomi 12 açısından istatistiksel olarak

anlamli fark saptanmadı ($p > 0,05$) (Tablo III). ZAP-70 negatif grupta 7 (% 43,8) hastada, ZAP-70 pozitif grupta 3 (% 23,1) hastada hiçbir FISH anormalliği saptanmadı ($p = 0,43$).

ZAP-70 pozitif grupta 4 (% 23,5) hastada, kötü sitogenetik özelliklerden (11q delesyonu, 17p delesyonu) en az biri mevcutken ZAP-70 negatif grupta 7 (% 23,3) hastada kötü sitogenetik özellik mevcuttu. ZAP-70 pozitif ve negatif gruplar arasında kötü sitogenetik anormallikler açısından fark saptanmadı ($p = 1,0$). ZAP-70 pozitif grupta iyi sitogenetik özelliklere sahip (tek başına 13q delesyonu olan veya sitogenetik anormallik saptanmayan) 7 (% 41,2) hasta varken ZAP-70 negatif grupta iyi sitogenetik özelliklere sahip 21 (% 70) hasta vardı. ZAP-70 pozitif ve negatif gruplar arasında iyi sitogenetik özellikler açısından zayıf anlamli fark saptandı ($p = 0,07$).

Kötü prognostik sitogenetik özellikler olan 11q ve 17p delesyonunun her ikisi de sadece 2 hastada mevcuttu. Bu hastalardan birinin ZAP-70'i pozitifken diğ erinin negatifdi.

Kötü sitogenetik özelliklere sahip hastalarla hiçbir FISH anormalliği saptanmayan hastalar arasında, tedavi gereksinimi açısından fark saptanmazken, tek başına 13q delesyonu olan hastaların tedavi gereksinimi anlamli derecede daha az bulundu ($p = 0,03$).

CD38 pozitif olan ($> \% 30$) 9 hastanın 3'ünde (% 33,3), CD38 negatif olan 32 hastanın 11'inde (% 34,4) 13q delesyonu tek FISH anormalliğiydi. CD38 pozitif olan 6 hastanın tamamında, CD38 negatif olan 21 hastanın 12'sinde (% 57,1) 11q, 17p delesyonu ya da trizomi 12'den biri saptandı. CD38 pozitif ve negatif hastalar arasında 13q delesyonu açısından anlamli fark saptanmazken ($p = 1,0$), kötü sitogenetik özellikler açısından zayıf anlamli fark gözlendi ($p = 0,07$).

Tablo III. ZAP-70 pozitif / negatif grupların CD38 ifadelenmesi ve FISH anormalliklerine göre dağılımı

	ZAP-70 pozitif	ZAP-70 negatif	p
CD38 > % 30	% 33,3	% 11,5	= 0,13
13q delesyonu*	% 23,5	% 46,7	= 0,14
Trizomi 12	% 35,3	% 30,6	= 0,13
11q delesyonu	% 23,5	% 10	= 0,20
17p delesyonu	% 11,8	% 16,7	= 0,50

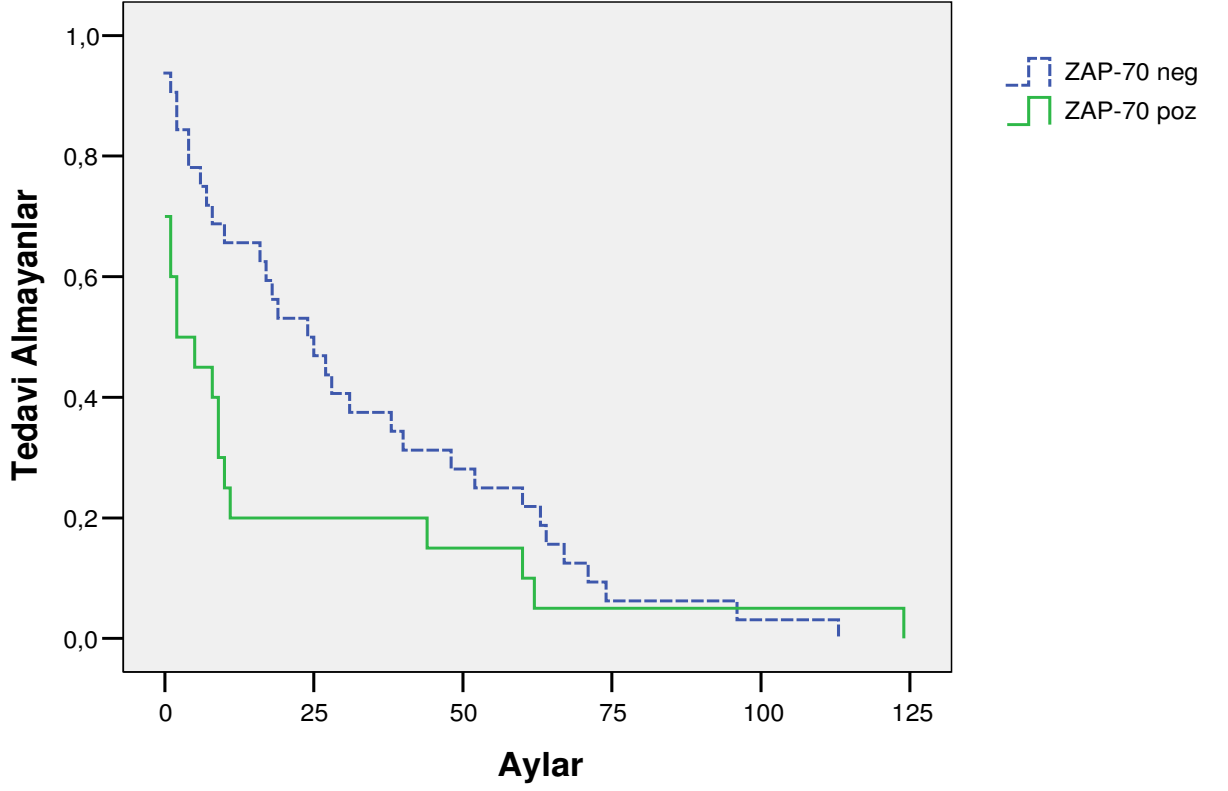
*Tek başına 13q delesyonu olan olgular

ZAP-70 ve Tedavi Gereksinimi İlişkisi

Tedavi gereksinimi olan 15 hastanın 10'unda (% 64) ZAP-70 pozitifken tedavi almayan 38 hastanın 10'unda (% 26,3) ZAP-70 pozitif bulundu.

ZAP-70 pozitif 20 hastadan 10'unun (% 50), ZAP-70 negatif 32 hastadan 5'inin (% 15,6) tedavi gereksinimi oldu. ZAP-70 pozitif ve negatif gruplar arasında tedavi gereksinimi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p = 0,02$).

Tedavi alan toplam 15 hastanın tanı-tedavi süresi 0-71 ay arasında değişmekteydi. Bu hastalardan ZAP-70 pozitif hastaların tedavisiz izlem süresi 0-60 ay, ZAP-70 negatif hastaların tedavisiz izlem süresi 0-71 ay arasında değişmekteydi. İki grup arasında tedavisiz izlem süreleri açısından zayıf anlamlı fark saptadık ($p = 0,08$) (Şekil 3).



Şekil 3. ZAP-70 pozitif ve negatif hastalarda tedavisiz izlem süresi, Kaplan- Meier analizi

ZAP-70, modifiye Rai evresi, LKS, CD38 ve sitogenetik anormalliklerinin tedavi gereksinimi üzerine yapılan çok değişkenli analizde, ZAP-70 bağımsız bir değişken olarak saptandı. Hastalık evresi, LKS, CD38 ve sitogenetik özelliklerin tedavi gereksinimi üzerine bağımsız olmayan değişken oldukları gözlendi (Tablo IV).

Tablo IV. Tedavi gereksinimi açısından çok değişkenli analiz

Değişkenler	p
ZAP-70	0,03
Modifiye Rai evre	0,35
LKS	0,14
CD38 >% 30	0,39
İyi sitogenetik özellik*	0,06
Kötü sitogenetik özellik**	0,42

* Sitogenetik anormallik saptanmayanlar ya da sadece 13q delesyonunun saptanması

** 11q delesyonu ve/veya 17p delesyonu bulunması

TARTIŞMA VE SONUÇ

KLL hücrelerinde, ZAP-70 ifadenmesini akım sitometri yöntemiyle çalıştık ve eşik değer olarak % 20'yi kullandık. Hastalarımızın % 61,5'unda ZAP-70 negatif, % 38,5'unda ZAP-70 pozitif bulundu. ZAP-70 pozitif ve negatif gruplar arasında BK, lenfosit yüzdesi, Plt sayısı açısından fark saptamamakla birlikte Hb düzeyi, ZAP-70 pozitif grupta anlamlı olarak düşüktü ve Hb ile ZAP-70 arasında negatif ilişki gözledik. ZAP-70 ifadenmesi ile Rai evrelendirmesi arasında pozitif ilişki saptadık.

Çalışmaya alınan hastalardan ZAP-70 ifadenmesi % 20'nin üzerinde olan hastaların, ZAP-70 ifadenmesi % 20'nin altında olan hastalara göre daha fazla tedavi gereksinimi olduğunu saptadık. Daha önceki çalışmalarda da benzer sonuçlar mevcuttu (21,38,39,63,74). Dürig ve ark. çalışmasında, ZAP-70 negatif hastaların % 80'inin tedavi gereksinimi olmamış ya da yoğun olmayan kemoterapiler almışlardır. Oysa ZAP-70 pozitif gruptaki hastaların % 59'unun yoğun kemoterapi gereksinimi olmuştur (25).

Tedavi alan ZAP-70 pozitif hastaların çoğunluğunun tanı anında tedavi gereksinimi oldu. ZAP-70 pozitif ve negatif gruplar arasında tedavisiz izlem süresi açısından zayıf anlamlı fark saptadık. Bu, hasta sayısının az olmasına ve ortanca takip süresinin kısa olmasına bağlı olabilir. Weinberg ve ark. yaptığı çalışmada da ZAP-70 ile tedavisiz izlem süresi arasında ilişki gözlenmemiştir (79). Rassenti ve ark.'nın 307 KLL hastasıyla yaptığı çalışmada, ZAP-70 negatif olan grupta, ortanca tedavisiz izlem süresi 9,2 yıl, ZAP-70 pozitif grupta, ortanca tedavisiz izlem süresi 2,9 yıl saptanmıştır ($p < 0,001$). Bu çalışmada ZAP-70 ifadenmesi, tedavi gereksiniminin önemli bir belirleyicisi olarak bildirilmiştir (63). Diğer çalışmalar da

ZAP-70 pozitif hastalarda tedavisiz izlem süresinin daha kısa olduğu desteklenmektedir (25,44).

Orchard ve ark. çalışmasında, ZAP-70 ifadenmesinin eşik değeri olarak % 10'u belirlemişlerdir (56). Rassenti ve ark. yaptığı çalışmada ZAP-70 ifadenmesinin eşik değeri olarak % 10 ya da % 30 alındığında tedavisiz izlem süresi açısından fark bulamamışlardır. Eşik değeri olarak % 20 alındığında önemli ilişki saptanmıştır (63).

ZAP-70 pozitif KLL hastaları, ZAP-70 negatif KLL hastaları ile karşılaştırıldığında daha saldırgan klinik ile karakterizedir (25). Çeşitli çalışmalarda iki grup arasında ilerlemesiz sağ kalım açısından anlamlı fark ortaya konulmuştur (25,63,80). ZAP-70 pozitif olan hastaların toplam sağkalımının ZAP-70 negatif hastalara göre daha kısa olduğu gösterilmiştir (21,25,44,56). Crespo ve ark. çalışmasında da erken evre hastalarda ZAP-70 negatif grupta sağkalım avantajı gösterilmiş fakat tüm hastalar analiz edildiğinde ZAP-70 ifadenmesiyle sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (13). Karşıt olarak Weinberg ve ark.'nın çalışmasında, ZAP-70 pozitif hastalarda kısa sağkalım gözlenmiş fakat fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (79).

ZAP-70 pozitif hastaların çoğunluğunun kemik iliği infiltrasyonu yaygın tip olmasına karşın ZAP-70 pozitif ve negatif gruplar arasında kemik iliği infiltrasyon tipi açısından anlamlı fark saptamadık. Bir çalışmada yaygın infiltrasyon tipine sahip hastaların tamamının ZAP-70 ifadenmesi pozitif saptanmıştır (73).

ZAP-70 ile LKS arasında ilişki saptadık. ZAP-70 pozitif olguların % 55,6'sında LKS 12 aydan kısaydı. Del Principe ve ark.'nın çalışmasında da LKS 12 ayın altında olan hastaların çoğunluğunun ZAP-70'i pozitifdir (21). KLL'de LKS ile sağkalım arasında ilişki kimi çalışmalarda gösterilmiştir (54,79). LKS, KLL'de önemli bir prognostik belirteç olmasına karşın tedavi kararında bu belirtecin temel alınması, bazı hastalarda tedavinin gecikmesine yol

açabilir (48). ZAP-70 ifadelenme düzeyinin akım sitometrik yöntem sayesinde daha tanı aşamasında bile tespit edilebilmesi nedeniyle, ZAP-70, LKS'nden daha hızlı bir şekilde KLL hastalarını prognoz açısından değerlendirmemizi sağlamaktadır.

CD38 ifadelenmesinin eşik değeri olarak % 30 alındığında, ZAP-70 negatif ve pozitif gruplar arasında anlamlı fark saptamazken, eşik değer olarak % 20 alındığında anlamlı fark saptadık. Del Principe ve ark. çalışmasında, ZAP-70 pozitifliği ile CD38 ifadelenmesi % 30'un üzerinde olan hastalar arasında önemli ilişki gözlenmiştir (21). Dürig ve ark. CD38 eşik değerini % 20 alarak benzer ilişki saptamıştır (25). Hus ve ark. iki eşik değer arasında önemli farklılık olmadığını rapor etmişlerdir (39).

KLL hastalarında, % 20 veya % 30 eşik değerinde CD38 ifadelenmesiyle tedavi gereksinimi arasında anlamlı ilişki gözlemedik. ZAP-70 ve CD38'in beraber analizinin her ikisinin tek başına olan analizinden daha önemli bilgiler verdiğine dair raporlar yayınlanmaktadır (17,21,25,39). Schroers ve ark. 252 KLL hastası ile yaptıkları çalışmada ZAP-70 ve CD38'in (>% 30) birlikte pozitifliğinde klinik gidişin kötü olduğunu göstermişlerdir (74). Del Giudice ve ark. CD38 ve ZAP-70'in her ikisinin erken evre KLL hastalarında tedavisiz izlem süresinin önemli bir belirleyicisi olduğunu rapor etmişlerdir. ZAP-70 ve CD38'in beraber analiziyle hastaları iyi, orta ve kötü prognozlu olmak üzere 3 gruba ayırmışlardır. Bu çalışmada, ZAP-70 ve CD38'in her ikisinin de pozitif olduğu grupta klinik gidiş kötü, ZAP-70 pozitif / CD38 negatif ve ZAP-70 negatif / CD38 pozitif gruplarda prognoz orta, her ikisinin de negatif olduğu grupta klinik gidiş iyidir (20). Çalışmamızda ZAP-70 negatif / CD 38 negatif grupta tedavi gereksinimini anlamlı oranda az bulduk. Önceki çalışmalarda ZAP-70 ve CD38'in her ikisinin pozitif olduğu hastalarda ortanca tedavisiz izlem süresi, her ikisinin negatif olduğu hastalardan kısa bulunmuştur (17,20,74)

Çok değişkenli analizde, hastalarımızda ZAP-70'in tedavi gereksinimi üzerine bağımsız değişken olduğunu saptadık. Modifiye Rai evresi, LKS, CD38 ve sitogenetik özelliklerin tedavi gereksinimi üzerine bağımsız olmayan değişken oldukları gözlemlendi. D'Arena ve ark. ZAP-70 / CD38 durumu, hastalık evresi, Hb ve Plt düzeylerinin bağımsız prognostik rolü olduğunu göstermişlerdir (17). ZAP-70'in tedavisiz izlem süresi üzerine bağımsız değişken olduğu kimi çalışmalarla desteklenmiştir (20,38,44,74). Weinberg ve ark. çalışmasında ZAP-70'in tedavisiz izlem süresi üzerine bağımsız bir değişken olmadığı gösterilmiştir (79).

ZAP-70 ifadenmesi, Western blot, nicel RT-PCR, immünohistokimyasal olarak ve akım sitometri gibi farklı yöntemlerle ölçülebilir (1,13). Akım sitometriyle KLL hücrelerinde, T hücrelerinde ve NK hücre gruplarında, ZAP-70 pozitif hücre yüzdesi analiz edilebilir (13). Western blot ve RT-PCR'da örneklerde T hücreleri de bulunduğu için ZAP-70 ifadenmesi olduğundan daha yüksek bir değerde saptanır (9,69). Rassenti ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, akım sitometri ve immün blot yöntemiyle analiz edilen ZAP-70 ifadenmesi ilişkili bulunmuştur (63). Akım sitometri ile RT-PCR yönteminin, 28 hasta üzerinde karşılaştırıldığı başka bir çalışmada da sonuçlar ilişkili bulunmuştur (25). Wiestner ve ark. çalışmasında, nicel RT-PCR yöntemiyle DNA mikroarray yöntemiyle ölçtükleri ZAP-70 mRNA düzeyi arasında güçlü ilişki saptamışlardır. Kantitatif PCR, klinik laboratuvarlarda kullanılmakla birlikte işlem öncesinde lösemik hücrelerin arındırılması gerekmektedir. İmmünohistokimyasal olarak ZAP-70'in ölçülmesi için arındırılma işlemine gerek yoktur fakat yarı niceldir ve ZAP-70 ifadenmesinin orta düzeyde olduğu durumlarda yanlış negatif sonuç verebilir (80). Klinik laboratuvarlarda akım sitometrik yöntemin ZAP-70 ve CD38'in her ikisinin de tespitinde kullanılabilmesi, IgVH mutasyon analizine göre daha uygun ve kullanışlı olmasını sağlamaktadır (64). KLL'de ZAP-70 ifadenmesinin ölçümünde kullanılan yöntemlerde tartışmalı noktalar vardır. Bunlar başlıca, iç kontrolde normal B

hücrelerine karşı T/NK hücreler kullanılması, izotip kontroller kullanılması ya da farklı ZAP-70 kopyalarından ve konjuge boya kullanımından kaynaklanmaktadır (64). Orchard ve ark. 167 KLL hastası ile yaptıkları çalışmada akım sitometrik yöntemle ölçtükleri ZAP-70'in KLL'de güvenilir bir belirteç olduğunu bildirmişlerdir (56). Bununla birlikte Wilhelm ve ark. akım sitometri sonuçlarında farklılık gözlemişlerdir (81). Bu nedenle bu protokollerin standardizasyonu için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (64).

Çalışmamızda, FISH ile hastaların % 78,7'sinde ile sitogenetik anormallik gösterdik. Yapılan çalışmalarda, sitogenetik anormallik sıklığı % 62-82 arasında değişmektedir (22,24,29,32,67,79). Sitogenetik anormallikler içerisinde en sık 13q delesyonu (% 65,9) gözlemlendi. Bunu, % 23,4 sıklıkla trizomi 12 izlerken 11q ve 17p delesyonu eşit sıklıkta gözlemlendi (% 14,9). Sitogenetik anormalliklerin sıklığı bazı çalışmalarda farklı saptanmıştır (32). Bunun nedeni, çalışmanın yapıldığı merkezlerin referans hastane olup olmasına bağlı olabilir (Çoğunluğunu kötü klinik seyirli hastaların oluşturması nedeniyle). 17p delesyonu en kötü prognozlu sitogenetik anormallik olduğu halde çalışmamızda, 17 p delesyonu olan 7 hastanın sadece 1'inde, 11q delesyonu saptadığımız 7 hastanın 2'sinde tedavi gereksinimi oldu. Weinberg ve ark.'nın yaptığı çalışmada sitogenetik anormallikler ile tedavisiz izlem süresi ve sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (79). Çalışmamızda, kötü sitogenetik anormalliklerle tedavi gereksinimi arasında anlamlı ilişki saptamazken, tek başına 13q delesyonu olan hastalar içerisinde tedavi alanların sayısı anlamlı derecede düşük bulundu (18 hastanın 2'si, % 11,1).

ZAP-70 ile kötü sitogenetik özellikler arasında önemli ilişki saptamadık. Del Principe ve ark. ZAP-70 pozitif grupta kötü prognozlu sitogenetik anormalliklerin daha çok olduğunu göstermişlerdir (21).

KLL’de klinik durumun en iyi belirleyicisinin IgVH mutasyon durumu olduğunu bildiren çalışmalar vardır. IgVH mutasyonu olan olgularda IgVH mutasyonu olmayan olgulara göre klinik gidişin daha iyi olduğu bildirilmektedir (16,35,43) Bununla beraber IgVH mutasyonunun analizi, karmaşık, pahalı ve çalışma süresi uzundur (35,75). Bu nedenle rutin tanısal laboratuvar testi olarak kullanılması uygun değildir (38) . Crespo ve ark. 56 KLL hastasında akım sitometrik yöntemle saptadıkları ZAP-70 ifadenmesini, IgVH mutasyon durumuyla karşılaştırmışlardır. ZAP-70’in yüksek oranda ifadenmesi, mutasyonsuz IgVH ile ilişkili bulunmuştur (13). ZAP-70 ile IgVH mutasyon durumu ilişkisini destekleyen başka çalışmalar da vardır (25,56). Bununla beraber Rassenti ve ark. çalışması bunu desteklemekle birlikte, kimi olgularda ZAP-70 ifadenmesi ve IgVH mutasyon durumu arasında uyumsuzluk saptamışlardır ve KLL’de tedavi gereksiniminin belirlemede ZAP-70’in IgVH’den daha güçlü bir belirleyici olduğunu bildirmişlerdir (63).

NCI-WG ölçütlerine göre Rai evre III / IV ve Binet evre C hastalarda erken tedavi endikasyonu varken Rai evre I / II ve Binet evre B hastalarda ilerleyici hastalık belirti ve bulguları mevcutsa tedavi endikasyonu vardır. Rai evre 0 ve Binet evre A’da hastalık ilerlemesi oluncaya kadar bekle ve gör yöntemiyle izlenmesi önerilmektedir (10). Bu grupta IgVH mutasyon durumu, ZAP-70 gibi yeni biyolojik prognostik belirteçlere göre kötü klinik gidişli hastalara erken tedavinin yararları olabilir fakat bu konuda kontrollü klinik çalışmalara ihtiyaç vardır (31).

KLL’nin biyolojik prognostik belirteçleri arasında ZAP-70’in altın standart olabileceğini kabul eden görüşler vardır (3). KLL hastalarında, hızlı, pratik ve rutin laboratuvarlarda uygulanacak yöntemle hastalığın prognozu hakkında bilgi edinmemiz mümkün olmaktadır. Çalışmamızda, ZAP-70 ifadenmesinin KLL’de güvenilir bir prognoz belirteci olduğunu gösterdik. Özellikle hastaların ileride tedavi gereksinimi olup olmayacağının önceden

belirlenmesinde ZAP-70 çok değerlidir. Bu nedenle ZAP-70 pozitif olan hastaların daha hızlı seyredebileceği ve erken tedavi gereksinimleri olabileceği düşünölerek bu hastalar daha yakın izlenmelidir.

ÖZET

KLL, klinik seyri değişken bir hastalıktır. Kötü klinik seyir gösterecek hastaları önceden belirlemek çok önemlidir. Klinik evreleme sistemleri, erken evrede tanı konmuş hastalardan daha sonra hangilerinin hızlı seyredeceğini belirlemede yetersizdir. Çalışmamızda, ZAP-70 ifadenmesinin KLL hastalarındaki diğer prognostik belirteçlerle ilişkisini ve tedavisiz izlem süresine etkisini göstermeyi amaçladık.

Standart morfolojik ve immünofenotipik ölçütlerle tanı konulmuş olan 52 KLL hastası çalışmaya alındı. ZAP-70 ve CD38 ifadenmesini akım sitometrik yöntemle değerlendirdik. 47 hastada FISH'le 13q delesyonu, 11q delesyonu, p53 delesyonu ve trizomi 12 çalışıldı.

52 hastanın 32'sinde (% 61,5) ZAP-70 ifadenmesi % 20'nin altındayken, 20'sinde (% 38,5) ZAP-70 ifadenmesi % 20'nin üzerindeydi. ZAP-70 pozitif olan hastalarda, ZAP-70 negatif hastalara göre klinik evre daha ileri idi ($p=0,02$) ve Hb düzeyleri anlamlı olarak düşüktü ($p=0,02$) ve LKS anlamlı olarak daha kısaydı ($p=0,04$). ZAP-70 ifadenmesi ile CD38 ($>30\%$) ve sitogenetik anormallikler arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

ZAP-70 pozitif olan hastalarda tedavi gereksinimi ZAP-70 negatif gruptan anlamlı derecede fazlaydı ($p=0,02$). CD38 ifadenmesi ve FISH anormallikleriyle tedavi gereksinimi arasında anlamlı ilişki olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$). Çok değişkenli analizde, ZAP-70'in tedavi gereksinimi üzerine bağımsız değişken olduğu gözlemlendi ($p=0,03$).

Sonuç olarak ZAP-70 pozitif hastaların tedavi gereksinimlerinin fazla olduğunu saptadık. Akım sitometrik olarak ZAP-70 ifadenmesinin tanı anında saptanması, KLL hastalarının hangilerinin tedavi gereksinimi olacağını önceden belirlenmesinde çok değerlidir.

KAYNAKLAR

1. Bene MC. What Is ZAP-70? Cytometry B Clin Cytom. 70 (4): 204-208, 2006
2. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang G, Piguet H, Goasguen J, Vaugier G, Porton G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer 48 (1); 198-206, 1981
3. Bosch F, Muntanola A, Gine E, Carrio A, Villamor N, Moreno C, Crespo M, Montserrat E. Clinical Implications of ZAP-70 Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia. Cytometry B Clin Cytom; 70 (4):214-217, 2006
4. Bouafia F, Draï J, Bienvenu J, Thieblemont C, Espinouse D, Salles G, Coiffier B. Proliferative and prognostic values of serum LDH isoenzymes in patients with haematopoietic malignancies. Bull Cancer; 91(7-8) : E229-40, 2004
5. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic Lymphocytic Leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program; 163-83, 2004
6. Call TG, Phyllis RL, Noel P, Habermann TM, Beard CM, O'Fallon WM, Kurland LT. Incidence of chronic lymphocytic leukemia in Olmsted County, Minnesota, 1935 through 1989, with emphasis on changes in initial stage at diagnosis. Mayo Clin Proc.; 69(4): 323-8, 1994
7. Chan AC, Irving BA, Fraser JD, Weiss A. The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A; 88 (20): 9166-9170, 1991
8. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR, zeta chain. Cell; 71 (4): 649-62, 1992

9. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, Kipps TJ. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 100 (13): 4609-14, 2002
10. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR. National Cancer Institute-Sponsored Working Group Guidelines for Chronic Lymphocytic Leukemia: Revised Guidelines for Diagnosis and Treatment. *Blood*; 87 (12): 4990-4997, 1996
11. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Eng J Med*; 352 (8): 804-815, 2005
12. Christiansen I, Gidlöf C, Wallgren AC, Simonsson B, Tötterman TH. Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule 1 are increased in chronic B-lymphocytic leukemia and correlate with clinical stage and prognostic markers. *Blood*; 84 (9): 3010-3016, 1994
13. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marce S, Lopez-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*; 348 (18): 1764-75, 2003
14. Crespo M, Villamor N, Gine E, Muntanola A, Colomer D, Marafioti T, Jones M, Camos M, Campo E, Montserrat E, Bosch E. ZAP-70 expression in normal pro/pre B cells, mature B cells, and in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*. 12 (3 Pt 1): 726-34, 2006
15. Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R, De Angeli C, Veronese A, Cavazzini E, Bardi A, Roberti MG, Tammiso E, Agostini P, Ciccone M, Della Porta M, Tieghi a, Cavazzini L, Negrini M, Castoldi G. CLL with 6q-shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia*; 18 (3): 476-483, 2004
16. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M,

- Chiorazzi N. Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*; 94 (6): 1840-1847, 1999
17. D'Arena G, Tarnani M, Rumi C, Vaisitti T, Aydin S, De Filippi R, Perrone F, Pinto A, Chiusolo P, Deaglio S, Malavasi F, Laurenti L. Prognostic significance of combined analysis of ZAP-70 and CD 38 in chronic lymphocytic leukemia. *Am. J Hematol*; 82 (9):787-791, 2007
 18. Deaglio S, Dianzani U, Horenstein AL, Fernandez JE, van Kooten C, Bragardo M, Funaro A, Garbarino G, Di Virgillio F, Banchereau J, Malavasi F. Human CD38 ligand. A 120-KDA protein predominantly expressed on endothelial cells. *J Immunol*; 156 (2): 727-734, 1996
 19. Deaglio S, Capobianco A, Bergui L, Dürig J, Morabito F, Dührsen U, Malavasi F. CD38 is signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*; 102 (6): 2146-2155, 2003
 20. Del Giudice I, Morilla A, Osuji N, Matutes E, Morilla R, Burford A, Maravelaki S, Owusu-Ankomah K, Swansbury J, A'Hern R, Brito-Babapulle V, Catovsky D. Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*; 104 (10): 2124-32, 2005
 21. Del Principe MI, Del Poeta G, Buccisano F, Maurillo L, Venditti A, Zuchetto A, Marini R, Niscola P, Consalvo MAI, Mazzone C, Ottaviani L, Panetta P, Bruno A, Bomben R, Suppo G, Gegan M, Gattei V, Fabritiis P, Cantonetti M, Lo Coco F, Del Principe D, Amadori S. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 108 (3): 853-861, 2006
 22. Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, Bone ND, O'Fallon JR, Allmer C, James CD, Jelinek DF, Tschumper RC, Hanson CA, Pruthi RK, Witzig TE, Call TG, Kay NE. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation

- with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*; 121 (2): 287-95, 2003
23. Dighiero G. An attempt to explain disordered immunity and hypogammaglobulinemia in B-CLL. *Nouv Rev Fr Hematol*; 30 (5-6): 283-288, 1988
 24. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*; 343 (26):1910-1916, 2000
 25. Dürig J, Nüchel H, Cremer M, Führer A, Halfmeyer K, Fandrey J, Mörröy T, Klein-Hitpass L, Dührsen U. ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*; 17 (12): 2426-2434, 2003
 26. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai K, Rassenti LZ, Kipps TJ, Dighiero G, Schroeder HW Jr, Ferrarini M, Chiorazzi N. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest*; 102 (8):1515-1525, 1998
 27. Fayad L, Keating MJ, Reuben JM, O'Brien S, Lee BN, Lerner S, Kurzrock R. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood*; 97 (1): 256-263, 2001
 28. Ferrajoli A, Keating MJ, Manshouri T, Giles FJ, Dey A, Estrov Z, Koller CA, Kurzrock R, Thomas DA, Faderi S, Lerner S, O'Brien S, Albitar M. The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 100 (4): 1215-1219, 2002
 29. Finn WG, Kay NE, Kroft SH, Church S, Peterson LC. Secondary abnormalities of chromosome 6q in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a sequential study of karyotypic instability in 51 patients. *Am J Hematol*; 59 (3): 223-9, 1998

30. Funaro A, Spagnoli GC, Ausiello CM, Alessio M, Roggero S, Delia D, Zaccolo M, Malavasi F. Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation. *J Immunol*; 145 (8): 2390-2396, 1990
31. Ghia P, Ferreri AM, Galigaris-Cappio F. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007
32. Glassman A, Hayes KJ. The value of fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*; 158 (1), 88-91, 2005
33. Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, Ostwald M, Busch R, Kuhn-Hallek I, Thiel E, Emmerich B. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 93 (5): 1732-1737, 1999
34. Hamblin TJ, Oscier DG, Young BJ. Autoimmunity in chronic lymphocytic leukaemia. *J Clin Pathol*; 39 (7): 713-716, 1986
35. Hamblin TJ, Davis Z, Gardnier A, Oscier D, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 94 (6): 1848-1854, 1999
36. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. CD 38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*; 99 (3): 1023-1029, 2002
37. Hamblin TJ. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*; 20 (3): 455-468, 2007

38. Hayat A, O'Brien D, O'Rourke P, McGuckin S, Fitzgerald T, Conneally E, Browne PV, McCann SR, Lawler MP, Vandenberghe E. CD38 expression level and pattern of expression remains a reliable and robust marker of progressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *LeukLymphoma*; 47 (11): 2371-2379, 2006
39. Hus I, Podhorecka M, Bojarska-Junak A, Rolinski J, Schmitt M, Sieklucka M, Wasik-Szczepanek E, Dmoszynska A. The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol*; 17 (4): 683-690, 2006
40. Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, Lerner S, Kantarjian HM, Albitar M. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 98 (1): 181-186, 2001
41. Karhu R, Tobin G, Thunberg U, Vilpo L, Sundström C, Knuutila S, Rosenquist R, Vilpo J. More extensive genetic alterations in unmutated than in hypermutated cases of chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*; 37 (4): 417-420, 2003
42. Kato I, Takasawa S, Akabane A, Tanaka O, Abe H, Takamura T, Suzuki Y, Nata K, Yonekura H, Yoshimoto T, Okamoto H. Regulatory role of CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase) in insulin secretion by glucose in pancreatic beta cells. Enhanced insulin secretion in CD38-expressing transgenic mice. *J Biol Chem*; 270 (50): 30045-30050, 1995
43. Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Bruckle E, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 100 (4): 1410-1416, 2002
44. Kröber A, Bloehdorn J, Hafner S, Bühler A, Seller T, Kienle D, Winkler D, Bangerter M, Schlenk RF, Benner A, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of

- ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*; 24 (6): 969-75, 2006
45. Lai R, O'Brien S, Maushouri T, Rogers A, Kantarjian H, Keating M, Albitar M. Prognostic value of plasma interleukin-6 levels in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*; 95 (5): 1071-1075, 2002
 46. Latour S, Veillette A. Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling
Curr Opin Immunol;13 (3): 299-306, 2001
 47. Lipshutz MD, Mir R, Rai KR, Sawitsky A. Bone marrow biopsy and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 46 (6): 1422-1427, 1980
 48. Magnac C, Porcher R, Davi F, Nataf J, Payelle-Brogard B, Tang RP, Oppezso P, Levy V, Dighiero G, Ajchenbaum- Cymbalista F. Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL Leukemia; 17 (1): 133-137, 2003
 49. Mehes G. Chromosome Abnormalities with Prognostic Impact in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Pathol Oncol Res*; 11 (4):205-210, 2005
 50. Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*; 60 (11):2712-2716, 1987
 51. Molica S, Levato D, Cascavilla N, Levato L, Musto P. Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and β_2 -microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*; 62 (2): 117-122, 1999
 52. Molica S, Vitelli G, Levato D, Gandolfo GM, Liso V. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk of progression in early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*; 107(3):605-10, 1999

53. Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica*; 90 (3); 391-399, 2005
54. Montserrat E, Sanchez-Bisoso J, Vinolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol*; 62 (3): 567-575, 1986
55. Nolz JC, Tschumper RC, Pittner BT, Darce JR, Kay NE, Jelinek DF. ZAP-70 is expressed by a subset of normal human B-lymphocytes displaying an activated phenotype. *Leukemia*: 19(6); 1018-24, 2005
56. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, Hamblin TJ, Staudt LM, Oscier DG. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet*, 363 (9403): 105-111, 2004
57. Oscier D, Fegan C, Hillmen P, Illidge T, Johnson S, Maguire P, Matutes E, Milligan D, Guidelines Working Group of the UK CLL Forum British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*; 125 (3): 294-317, 2004
58. Pan L, Beveley PCL & Isaacson PG. Lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes and proliferative activity of lymphoid cells-an immunocytochemical study. *Clin Exp Immunol*; 86 (2), 240-245, 1991
59. Que TH, Marco JG, Ellis J, Matutes E, Babapulle VB, Boyle S, Catovsky D. Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia detected by fluorescence in situ hybridization: analysis by stage, immunophenotype and morphology. *Blood*; 82 (2): 571-575, 1993
60. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical Staging of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*; 46 (2): 219-34, 1975

61. Rai KR, Han T. Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*; 4 (2): 447-456, 1990
62. Rambotti P, Davis S. Lactic Dehydrogenase in Normal and Leukemia Lymphocyte Subpopulations: Evidence for the Presence of Abnormal T Cells and B cells in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*; 57 (2), 324-327, 1981
63. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberg DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70 Compared with Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Mutation Status as a Predictor of Disease Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*; 351 (9): 893-901. 2004
64. Rassenti LZ, Kipps TJ. Clinical utility of assessing ZAP-70 and CD38 in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*; 70 (4): 209-13. 2006
65. Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, Botteman MF, Pashos CL. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Cancer Care (Engl)*; 13 (3): 279-87, 2004
66. Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Levey RH, Schlossman SF. Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 77 (3): 1588-1592, 1980
67. Ripolles L, Ortega M, Ortuno F, Gonzalez A, Losada J, Ojanguren J, Soler JA, Bergua J, Coll MD, Caballin MR Genetic abnormalities and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*; 171 (1): 57-64. 2006
68. Robertson LE, Plunkett W, McConnell K, Keating MJ, McDonnell TJ. Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia*; 10 (3): 456-459, 1996

69. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*; 194 (11): 1639-47, 2001
70. Rozman C, Hernandez-Nieto L, Montserrat E, Bragues R. Prognostic significance of bone-marrow patterns in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol*; 47(4); 529-537, 1981
71. Rozman C, Montserrat E, Rodriguez-Fernandez JM, Ayats R, Vallespi T, Parody R, Rios A, Prados D, Morey M, Gomis F, Alcala A, Gutierrez M, Maldonado J, Gonzalez C, Giralt M, Hernandez-Nieto L, Cabrera A, Fernandez-Ranada JM. Bone Marrow Histologic Pattern- The Best Single Prognostic Parameter in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Multivariate Survival Analysis of 329 Cases. *Blood*; 64 (3):642-648, 1984
72. Sarfati M, Chevret S, Chastang C, Biron G, Stryckmans P, Delespesse G, Binet JL, Merle-Beral H, Bron D. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 88 (11): 4259-4264, 1996
73. Schade U, Bock O, Vornhusen S, Jager A, Büsche G, Lehmann U, Kreipe H. Bone marrow infiltration pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia is related to immunoglobulin heavy-chain variable region mutation status and expression of 70-kd zeta-associated protein (ZAP-70). *Hum Pathol*; 37 (9): 1153-1161, 2006
74. Schroers R, Griesinger F, Trümper L, Haase D, Kule B, Klein-Hitpass L, Sellmann L, Dührsen U, Dürig J Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*; 19 (5): 750-8, 2005
75. Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: intergrating molecular biologic insights into clinical practice for patient with CLL. *Blood* ; 103 (4), 1202-1210, 2004

76. Sheridan R, Mounajjed T, Ehrmann DE, Hurtubise PE, Schrager A. Comparison of Bone Marrow and Peripheral Blood ZAP-70 Status Examined by flow Cytometry. *B Clin Cytom*; 70 (4): 320-321, 2006
77. Stankovic T, Hubank M, Cronin D, Stewart GS, Fletcher D, Bignell CR, Alvi AJ, Austen B, Weston vJ, Fegan C, Byrd PJ, Moss PA, Taylor AM. Microarray analysis reveals that TP53- and ATM-mutant B-CLLs share a defect in activating proapoptotic responses after DNA damage but are distinguished by major differences in activating prosurvival responses. *Blood*; 103 (1): 291-300, 2004
78. Van Oers NS, Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signaling processes. *Semin Immunol*; 7 (4): 227-236, 1995
79. Weinberg JB, Volkhemier AD, Chen Y, Beasley BE, Jiang N, Lanasa MC, Friedman D, Vaccaro G, Rehder CW, Decastro CM, Rizzieri DA, Diehl LF, Gockerman JP, Moore JO, Goodman BK, Levesque MC. Clinical and molecular predictors of disease severity and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*; [Epub ahead of print], 2007
80. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, Zhao H, Ibbatson RE, Orchard JA, Davis Z, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Arthur DC, Marti GE, Wilson WH, Hamblin TJ, Oscier DG, Staudt LM. ZAP -70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*; 101 (12): 4944-4951, 2003
81. Wilhelm C, Neubauer A, Brendel C. Discordant results of flow cytometric ZAP-70 expression status in B-CLL samples if different gating strategies are applied. *Cytometry B Clin Cytom*; 70 (4): 242-50, 2006

82. Zent CS, Call TG, Hogan WJ, Shanafelt TD & Kay NE. Update on risk-stratified management for chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*; 47(9): 1738-1746, 2006.