



T. C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİLİ
HASTALARIN KEMİK İLİĞİ BİYOPSİ
ÖRNEKLERİNDE IgVH MUTASYON DURUMU İLE
ZAP70 VE CD38'İN İMMÜNHİSTOKİMYASAL
OLARAK ANALİZİNİN PROGNOSTİK ÖNEMİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. NESİBE KAHRAMAN ÇETİN

DANIŞMAN

Doç.Dr. Füzuan KACAR DÖĞER

AYDIN-2012

T. C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİLİ
HASTALARIN KEMİK İLİĞİ BİYOPSİ
ÖRNEKLERİNDE IgVH MUTASYON DURUMU İLE
ZAP70 VE CD38'İN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL
OLARAK ANALİZİNİN PROGNOSTİK ÖNEMİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. NESİBE KAHRAMAN ÇETİN

DANIŞMAN

Doç.Dr. Fûruzan KACAR DÖGER

AYDIN-2012

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından **TPF-10005** numaralı proje olarak desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Hayatımın en önemli deneyimlerinden biri olan uzmanlık eğitimim boyunca; geniş bilgi birikimine sahip oldukları patoloji konusundaki bilgilerinden sınırsız bir şekilde faydalanmama imkan tanıyarak, mesleki gelişimimde önemli yer sahibi olan; daima saygı ve hürmetle anacağım hocalarım Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Muhan ERKUŞ, Prof. Dr. Nil ÇULHACI, Doç. Dr. Füzuan KACAR DÖGER, Doç Dr. İbrahim METEOĞLU ve Doç Dr. Canten TATAROĞLU'na minnetlerimi sunuyorum.

Asistanlık dönemim boyunca birlikteliğimizden büyük keyif aldığımı, desteklerini her zaman hissettiğim başta Hicran TURHAN olmak üzere sevgili asistan arkadaşlarıma,

Çalışmalarında ve asistanlık sürecimin her aşamasında iş arkadaşı olarak titiz ve hassas davranışlarıyla benden yardımlarını esirgemeyen, eğitim sürecim boyunca keyifle çalıştığımız teknisyen arkadaşlarım Şirin ADIGÜZEL, Şengül BARUTÇA, Ayşegül ETENSEL, Efan KAYA, Halil Fatih KUZU, Seçil ZORLU, sekreter arkadaşlarım Hümeysra ERBAŞ ve Pınar AKAR'a,

Tezimin genetik aşamasını yapmak için laboratuvarın her imkanını bana sunan Prof. Dr. Gökay BOZKURT, verdiği destek ve özveriyle yardımları nedeniyle başta Dr. Serkan KURTGÖZ olmak üzere, Dr Ece KESKİN, Metin ÇALIŞKAN, Aylin ÜSKÜPLÜ, Yeşim CANÖZLER ve Cansu SEVİM'e,

Tezi bitirebilmemde emeği olan İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden Dane RUSCUKLU 'ya,

Tezimin klinik verilerini sağlayan Doç. Dr. İrfan YAVAŞOĞLU, arşiv tarama ve veri toplamada büyük desteği olan Senem ÜNSAL'a,

Daha ismini sayamadığım bu zorlu süreç boyunca bana katkısı olan herkese,

İhtiyacım olan her an yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen annem, babam ve kardeşime, sevgi, ilgi, güven duygusu yanında bana sınırsız anlayış ve yardımını sunan eşim Dr. Mevlüt ÇETİN, yaşamımın anlamı ve en güzel rengi olan biricik oğlum Yavuzalp'e,

Teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Nesibe KAHRAMAN ÇETİN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	3
İÇİNDEKİLER	4
TABLO DİZİNİ	6
ŞEKİL DİZİNİ	6
RESİM DİZİNİ	7
KISALTMA DİZİNİ	8
1. GİRİŞ VE AMAÇ	9
2. GENEL BİLGİLER	11
2.1. Lenfomalar ve B hücreli neoplazmlar	11
2.2. B lenfositlerin gelişimi	13
2.3. B hücreli neoplazmların gelişimi	13
2.4. Kronik lenfositik lösemi	15
2.4.1. Tanım	15
2.4.2. Epidemiyoloji	15
2.4.3. Fizyopatoloji	16
2.4.4. Klinik özellikler	17
2.4.5. Tanı kriterleri	18
2.4.6. Morfolojik kriterler	20
2.4.7. İmmünofenotipik özellikler	24
2.4.8. Sitogenetik ve moleküler özellikler	27
2.4.9. Prognoz ve belirleyici faktörler	28
2.4.10. Malign transformasyon ve klinik progresyon	42
2.4.11. Ayırıcı tanı	44
2.5. IgVH mutasyonu	49
2.6. İmmünohistokimyasal markerlar	52
2.6.1. ZAP70 ekspresyonu	52
2.6.2. CD38 ekspresyonu	55

3. GEREÇ VE YÖNTEM	58
3.1. İmmünohistokimyasal Boyama	59
3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Sekans analizi	62
3.3. İstatistiksel değerlendirme	68
4. BULGULAR	69
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	85
7.ÖZET	88
8.SUMMARY	90
9. KAYNAKLAR	92

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: 2008 WHO sınıflamasına göre B hücreli neoplazmlar

Tablo 2: Kronik lenfositik lösemi’de Tanı kriterleri

Tablo 3: Kronik lenfositik lösemide immünofenotipleme

Tablo 4: Kronik lenfositik lösemi’de immünofenotipik skorelama sistemi

Tablo 5: Kronik lenfositik lösemi’de kullanılan prognostik faktörler

Tablo 6: Kronik lenfositik lösemi’de Rai evreleme sistemi

Tablo 7: Kronik lenfositik lösemi’de Binet evreleme sistemi

Tablo 8: Kronik lenfositik lösemi’de görülen kromozomal anormallikler

Tablo 9: Kronik lenfositik lösemi’de ayırıcı tanı

Tablo 10: CD38’in bulunduğu hücre ve dokular

Tablo 11: Olguların genel özellikleri

Tablo 12: Olguların dekadrlara göre yaş ve cinsiyet dağılımı

Tablo 13: Kemik iliği infiltrasyon paternine göre ZAP70 ve CD38 boyanma dağılımı

Tablo 14: ZAP70 ve CD38 imünohistokimyasal markerların ekspresyon dağılımları

Tablo 15: Altı hastaya ait mutasyon durumu, kemik iliği infiltrasyon paterni ve imünohistokimyasal özellikleri

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: B lenfositlerin gelişimi ve B hücreli neoplazmlar

Şekil 2: KLL’de kemik iliği infiltrasyon paternleri

Şekil 3: Kromozom 14q32.3’de lokalize IGH gen kompleksinin şematik diagramı

Şekil 4: ZAP70’in moleküler yapısı

Şekil 5: CD38 tip 2 transmembran proteini

Şekil 6: Olguların Binet klinik evreye göre tedavi durumlarının dağılımı

Şekil 7: Olguların kemik iliği infiltrasyon paternlerine göre Binet klinik evre ve tedavi durumlarının dağılımı

Şekil 8: Kemik iliği infiltrasyon paternlerine göre ZAP70 ve CD38 pozitiflik oranlarının dağılımı

Şekil 9: Olguların kümülatif sağkalım grafiği

Şekil 10: Olguların Binet klinik evrelerine göre kümülatif sağ kalım grafiği

RESİM DİZİNİ

Resim 1: KLL’de periferik kan incelemesinde görülen lenfoid hücreler:

a) Tipik lenfositler (H&E, x1000) b) Atipik lenfositler (H&E, x1000)

Resim 2: Kemik iliği infiltrasyon paternleri: A) diffüz, B) nodüler, C) interstisyel ve D) mikst tutulum. (H&E, X200)

Resim 3: ZAP70 ile boyanma oranları: A) <%25 pozitif, B) %25-50 pozitif, C) % 51-75 pozitif, D) >%75 pozitif. (Anti-ZAP70, X200)

Resim 4: CD38 ile boyanma oranları: A) <%10, B) %11-20, C) %21-30, D) >%30 (Anti CD38, X200)

Resim 5: VH1 ve VH5 primerlerinde 250-300 bp aralığında bant oluşumu izlenen bir hastaya ait jel görüntüsü

Resim 6: VH3 (3-21) primerinde mutasyon saptanan bir hastaya ait sekans görüntüsü ve database ile karşılaştırılması

KISALTMA DİZİNİ

KLL	Kronik lenfositik lösemi
IgVH	İmmünglobulin ağır zincir değişken bölgesi
ZAP70	Zeta zincir ilişkili protein kinaz 70
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
NK	Natural Killer
BCR	B hücre reseptörü (B Cell Reseptor)
Ig	İmmünglobulin
SLL	Küçük lenfositik lenfoma (Small Lymphocytic Lymphoma)
DNA	Deoksiribonüleik asit
M-KLL	Mutasyonlu Kronik lenfositik lösemi (Mutated KLL)
U-KLL	Mutasyonsuz Kronik lenfositik lösemi (Unmutated KLL)
NCI-WG	National Cancer Institute-sponsored Working Group
MCL-1	Mantle cell lymphoma-1
EBV	Epstein Barr Virüsü
LKZ	Lenfosit sayısının ikiye Katlanma Zamanı
TK	Timidin kinaz
B2MG	B2 mikroglobulin
FİSH	Floresan in situ hibridizasyon
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
LDH	Laktat dehidrogenaz
PLL	Prolenfositik lösemi
TdT	Terminal deoksiribonükleotidil Transferaz
IGH	İmmünglobulin geni
FR	Framework
CDRs	Complementarity determining regions
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Kronik lenfositik lösemi (KLL), matür CD5+/CD19+ B lenfositlerin çoğalarak kan, kemik iliği ve lenfoid dokularda biriktiği lenfoproliferatif bir hastalıktır. Batı ülkelerinde en sık görülen lösemi tipidir (1). Tüm lösemilerin yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır. Genellikle ileri yaş hastalığıdır (2,3).

Kronik lenfositik lösemi'nin seyri son derece değişkendir. Bu nedenle bireysel prognoz ve risk değerlendirmesi önemlidir (4). Bazı olgularda hastalık yavaş seyirli olup tedavi gerektirmezken, bazı olgularda ise, tanıdan kısa bir süre sonra tedavi gereksinimi olur (5). Toplam sağkalım aylar ile sınırlı olabileceği gibi, dekadlar ile ifade edilebilecek kadar uzun da olabilir (6). KLL'nin değişken klinik seyrinden dolayı hızlı seyredecek hastaları önceden saptamak tedavi gereksiniminin belirlenmesi açısından önemlidir (7).

Kronik lenfositik lösemi prognozunun belirlenmesinde bir dizi klinik ve biyolojik faktör tanımlanmıştır (4,8). Hastalık evresi en önemli prognostik faktör olarak yerini korumaktadır (9). Rai ve Binet klinik evreleme sistemleri KLL'li hastaların tedavi gereksinimlerini ve ortalama sağkalımlarını öngörmeye faydalıdır. Ancak bu sınıflamaların prognostik değeri erken evre olgularda sınırlıdır (7). Oysa erken evrede başvuran olguların yaklaşık %30-40'ı ileri evrelere geçmekte ve yaşamlarını yitirebilmektedir. Bu olguların tanı sonrası belirlenmesi tedavinin bu doğrultuda seçilmesini sağlayabilir. Mevcut sınıflama sistemlerinin bu olguların ayrımındaki yetersizliği, erken dönemde prognozu belirlemeye yardımcı olacak faktörleri bulabilmek için, çeşitli çalışmalar yapılmasına neden olmuştur. Bu doğrultuda KLL'ye ait birçok molekül ile bunların genetik ve biyolojik özellikleri araştırılmıştır (6,10). Sitogenetik anomaliler, İmmunglobulin ağır zincir değişken bölgesinin (IgVH) mutasyon durumu, zeta zinciri ilişkili protein kinaz 70 (ZAP70) ve CD38 klinik seyir ve prognoz üzerine etkileri kanıtlanmış biyolojik faktörlerdir (3,4,8,9,11,12). Bu faktörlerin klinikte kullanılmasını kısıtlayan etken ise standardizasyon sorunudur (9,13). Bu nedenle, yaygın klinik kullanıma olanak sağlayan, ucuz ve basit prognostik faktörlere olan gereksinim artmaktadır.

Yapılan araştırmalarda KLL hücrelerinin iki farklı gruba ayrıldığı saptanmıştır. Bunlar; pregerminal merkez kaynaklı lösemik hücrelerden oluşan IgVH mutasyonu olmayan birinci grup ile germinal merkez veya germinal merkez sonrası hücrelerden oluşan somatik mutasyona uğramış ikinci gruptur. KLL hastalarının %50'sinde IgVH mutasyonu görülür ve iyi bir klinik gidiş gösterirler. Mutasyonu olmayanlara göre daha az tedaviye ihtiyaç duyarlar ve tedavisiz geçen süre daha uzundur. Yaşam süreleri de, mutasyonu olmayan olgulara göre önemli ölçüde fazladır. IgVH mutasyonu yeni ve iyi bir prognostik faktör olarak ortaya konmuştur (14,15,16,17). Ancak, IgVH

gen dizisinin belirlenmesi ve mutasyon varlığının araştırılması çok az sayıdaki laboratuarda yapılabilmektedir. Ayrıca moleküler genotipik analiz pahalı bir yöntem olduğundan rutin inceleme ve takip yöntemi olarak uygulanamamaktadır. Bu nedenle yeni çalışmalar bu mutasyon varlığını gösterebilecek farklı yöntemler üzerine yoğunlaşmıştır (7).

CD38 hematopoietik hücrelerde olgunlaşma ve aktivasyon evreleriyle ilişkilidir (13). CD38'in yüksek oranda ekspresyonu ileri evre hastalık ve kemoterapiye kötü yanıtla ilişkilidir (17, 18). CD38 ekspresyonu yüksek olan hastalarda, neoplastik hücrelerde atipik morfoloji, yaygın kemik iliği infiltrasyonu ve periferik lenfosit sayısında yükseklik daha sık gözlenir (13). Bu hastaların sağkalım süreleri daha kısadır (13,18,19). Yapılan çalışmalarda pregerminal merkezli lösemik hücrelerde CD38 ekspresyonunun yüksek, ancak mutasyona uğramış hücrelerde düşük olduğu, bu nedenle IgVH mutasyonunu göstermede CD38 ekspresyonunun kullanılabileceği öne sürülmüştür. Ancak günümüzde IgVH mutasyonu ve CD38 ekspresyonu birbirinden bağımsız prognostik faktörler olarak değerlendirilmektedir (20,21,22).

Zeta zincir ilişkili protein kinaz 70 (ZAP70) tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir (23,24). ZAP70'in KLL'de B hücre reseptör sinyali ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (25). Lösemik hücrelerde, ZAP70 ekspresyonunun %20'den fazla olması kötü prognostik özelliktir (21). Yapılan çalışmalarda ZAP70 ekspresyonunun IgVH mutasyonu ile korelasyon gösterdiği saptanmış olup, IgVH mutasyonunun olmadığı olgularda ZAP70 ekspresyonunun olduğu gözlenmiştir. ZAP70'in sadece mutasyon durumunu tespit etmekte değil aynı zamanda sağkalım ve progresyonu belirlemekte de önemli olacağı öne sürülmüştür (20). IgVH mutasyonu pahalı, tespiti zor ve ancak belli merkezlerde yapılabilen bir inceleme olması nedeniyle bunun yerine, kolay ve ucuz olan ZAP70'in kullanılması düşünülmüştür (26,27).

Kronik lenfositik lösemi'li olgularda IgVH mutasyon durumunun tanı anında hızlı bir şekilde gösterilebilmesi, prognoz ve tedavinin belirlenmesi açısından kritik öneme sahiptir. Çalışmamızda amaç, KLL'li vakaların kemik iliği biyopsi örneklerinde IgVH mutasyonu ile ZAP70 ve CD38 sentezinin gösterilerek, bu belirteçlerin mutasyon durumu, kemik iliği infiltrasyon paterni ve prognoz ile ilişkisini ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lenfomalar ve B Hücreli Neoplazmlar

Lenfomalar, bağışıklık sistemini oluşturan hücrelerin, çeşitli gelişim aşamalarından köken alan maligniteleridir. Köken aldıkları farklılaşma aşamasına göre değişik morfolojik, immünolojik ve klinik tablo oluştururlar. Lenfomaların sınıflandırılması hastalığın doğru teşhisi, klinik gidişi ve tedaviye yaklaşım yönünden oldukça önemlidir. Ancak lenfomalar bugüne kadar sınıflaması en sık değişen neoplazmlardır. İlk baştaki sınıflama sistemleri sitolojik ve histolojik özelliklere göre olup; daha sonraki güncel sınıflama sistemleri ise moleküler genotipik bulgular göz önüne alınarak oluşturulmuştur (28,29)

2008 World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü-WHO) sınıflaması klinik, immünolojik ve genetik veriler gözönüne alınarak oluşturulan ve günümüzde kullanılan son sınıflamadır (Tablo 1). Bu sınıflamada, hücre kökeni ve farklılaşma düzeyi temel alınmaktadır. Lenfoid maligniteler immatür B hücreli ve immatür T hücreli, matür B hücreli ve matür T hücreli neoplazmlar olarak ayrılmaktadır (30).

Tablo 1: 2008 WHO sınıflamasına göre B hücreli neoplazmlar

B hücreli Neoplazmlar
İmmatür B hücreli Neoplazmlar
B lenfoblastik lösemi/lenfoma, NOS
B lenfoblastik lenfoma/lenfoma, tekrarlayan genetik anormallikler
Matür B hücreli Neoplazmlar
B hücreli kronik lenfositik lösemi/küçük lenfositik lenfoma
B hücreli prolenfositik lösemi
Splenik marjinal zon B hücreli lenfoma
Tüylü hücreli lösemi
Splenik B hücreli lenfoma/lösemi, klasifiye edilemeyen
-Splenik diffüz kırmızı pulpa küçük B hücreli lenfoma
-Tüylü hücreli lösemi varyant
Lenfoplazmositik lenfoma
Ağır zincir hastalıkları
Plazma hücre neoplazmları
Mukozanın ektranodal marjinal zon lenfoması-lenfoid dokuyla ilişkili (MALT lenfoma)
Nodal marjinal zon B hücreli lenfoma
Foliküler lenfoma
Primer kutanöz follikül merkez lenfoması
Mantle hücreli lenfoma
Diffüz büyük B hücreli lenfoma (DLBCL), NOS
DLBCL, spesifik tipler
T hücre/histiyositten zengin büyük B hücreli lenfoma
Santral sinir sisteminde primer DLBCL
Primer kutanöz DLBCL, bacak tipi
Epstein-Barr virüsü (EBV) pozitif DLBCL
Büyük B hücrelerin diğer lenfomaları
Primer mediastinal (timik) B hücreli lenfoma
İntravasküler Büyük B hücreli lenfoma
İnflamasyonla ilişkili DLBCL
Lenfomatoid granülomatozis
ALK pozitif büyük B hücreli lenfoma
Plazmablastik lenfoma
HHV8 ile giden büyük B hücreli lenfoma-Multisentrik Castleman hastalığı ile ilişkili
Primer efüzyon lenfoma
DLBCL ve Burkitt lenfoma arasında özellikler ile giden B hücreli lenfoma
DLBCL ve Klasik Hodgkin lenfoma, Burkitt lenfoma arasında özellikler ile giden B hücreli lenfoma

2.2. B Lenfositlerin Gelişimi

Konak savunma mekanizması, yabancı antijenlere karşı ilk koruyucu engeli oluşturan ‘doğal bağışıklık’ ile daha geç devreye giren ve etkili korunma sağlayan ‘kazanılmış bağışıklık’ aşamalarından oluşur. Doğal bağışıklık, kompleman sistemi, makrofajlar, doğal öldürücü (Natural Killer-NK) hücrelerden oluşurken, kazanılmış bağışıklık esas olarak T ve B lenfositlerinden meydana gelir (31,32).

Lenfositler, antijenlere özgü reseptörler taşımaları nedeniyle kazanılmış bağışıklığı düzenleyen hücrelerdir. Lenfositler, monoklonal antikor panelleri ile tanınabilen (insan lökosit farklılaşma antijenleri-CD) yüzey proteinleri aracılığıyla tiplendirilirler. B lenfositler, esas olarak antikorlar aracılığıyla oluşan kazanılmış immün yanıtı düzenleyen hücrelerdir (31,33). B lenfositler kemik iliğinde, T lenfositler timusta olgunlaşırlar. Kemik iliğinde bulunan hematopoietik kök hücreler, ortak lenfosit progenitor hücrelere dönüşürler. Kemik iliğinde %0,02 oranında bulunan bu hücreler daha sonra olgunlaşmamış B hücrelerine dönüşürler (31,32,34). B Hücre Reseptörü (B Cell Receptor-BCR) birbirine disülfid bağlarıyla bağlanmış iki ağır ve iki hafif zincir içeren heterodimer bir yapıdır (31,35). B lenfositlerin uyarılması ve ‘klonal çoğalma’ adı verilen sürecin başlamasıyla antijene özgü hücreler çoğalır ve antikor salgılayan efektör hücreler oluşur (31,32,34). B hücresinde Ig ağır zincir düzenlenmesinin ardından hafif zincir oluşumu gerçekleşir. Böylelikle yüzeyinde tam bir Ig molekülü bulunan matür B hücresi oluşur ve erken-antijen bağımsız evre tamamlanmış olur. Matür ancak antijenle karşılaşmamış B hücresi kemik iliğinden ayrılarak periferik lenfoid dokulara gider. Geç ya da antijene bağımlı evrede, antijenle karşılaşan B hücreleri lenf nodlarının germinal merkezlerinde toplanır ve bir dizi genetik değişikliklerle antikor sentezleyebilen B hücreleri veya bellek hücrelerine dönüşürler (32-35,36,37).

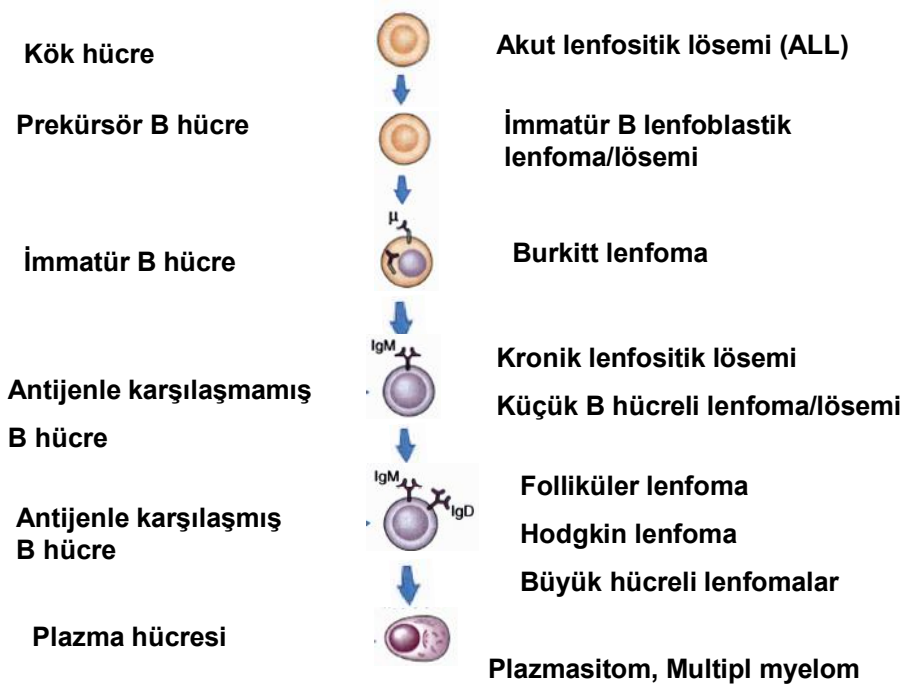
2.3. B hücreli neoplazmların gelişimi

B lenfosit neoplazmları, B hücrelerinin gelişim aşamasındaki farklı basamaklardan ortaya çıkan klonal hastalıklardır (Şekil 1). B hücre gelişiminde antijene bağımlı olmayan ve antijene bağımlı olan iki dönem mevcuttur. Antijene bağımlı olmayan B hücre gelişimi kemik iliğinde gerçekleşir. Kemik iliğinde kök hücreleri proB lenfositlere dönüştüklerinde yüzeylerinde CD19, CD79a, CD34, CD10 ve TdT taşırlar. Bu hücrelerde önce ağır zincirde çeşitlilik (D) segmenti, eklenme (J) segmenti ile birleşir, daha sonra değişken (V) DJ bölge birleşmesi gerçekleşir ve hücrelerde sitoplazmik μ zinciri yapılmaya başlanır. Bu hücreler olgunlaşmamış B hücrelerdir. Bu aşamalardaki lenfositlerden oluşan lenfoma ve lösemilere immatür B lenfoblastik lenfoma/lösemi denir. Bir sonraki aşamada Ig hafif zincir genlerinde rekombinasyon gerçekleşir. Böylece hücreler membran yüzeylerinde IgM molekülü taşımaya başlarlar ve periferik dokulara

geçerler. CD20 ve CD22 taşıyan ve matür B hücreleri olarak isimlendirilen, bu hücrelerde TdT ve CD10 ekspresyonu artık yoktur (28).

Antijene bağımlı evrede IgM ve IgD molekülleri hücre yüzeyinde belirir ve bu hücreler kanda dolaşır, lenfoid dokulardaki primer folikülleri oluştururlar. Mantle hücreli lenfoma, KLL ve Küçük B hücreli lenfoma/lösemilerin bir kısmının bu aşamadaki hücrelerden geliştiği düşünülmektedir. B lenfositler antijenle karşılaştıktan sonra lenfoid dokularda parakortekste blastik görünümlü büyük B hücrelerine değişerek aktive olurlar veya IgM üreten kısa ömürlü plazma hücrelerine dönüşürler, foliküllere giderek aktivasyonlarını sürdürürler ve folikül merkezlerinde sentrosit ya da daha büyük sentroblastlardan oluşan germinal merkez B hücrelerini oluştururlar. Bu aşamadan sonra immünglobulin genlerinde somatik mutasyonlar başlar. Bu aşamalarda Burkitt lenfoma, Folliküler lenfoma, Hodgkin lenfoma ve Büyük hücreli lenfomalar gelişmektedir (28).

Aktive B lenfositleri daha sonra hafıza hücrelerine dönüşerek lenfoid dokuda foliküllerin etrafındaki marjinal bölgeye yerleşirler. Marjinal zon lenfomaları bu aşamada ortaya çıkar. Antijenle yeniden karşılaşıldığında dalak marjinal zonundaki B hücreleri, germinal merkez plazma hücrelerinden oluşan tümörlere plazmasitom veya myelom adı verilmektedir (28).



Şekil 1: B lenfositlerin gelişimi ve B hücreli neoplazmlar

2.4. Kronik Lenfositik Lösemi

2.4.1.Tanım

Kronik lenfositik lösemi 1900'lü yılların başında tanınmaya başlanmış bir antite olup; 1970'lerde klinikopatolojik sınıflamalarda diffüz, düşük dereceli, B hücreli non-Hodgkin lenfomalar içinde kategorize edilmiştir. KLL ve Küçük lenfositik lenfoma (Small Lymphocytic Lymphoma-SLL) klinikopatolojik özelliklerinin benzerliği nedeniyle, 2001 WHO sınıflamasında tek bir kategori (KLL/SLL) altında toplanmıştır (38). KLL/SLL tipik olarak CD5 ve CD23 yüzey antijeni eksprese eden küçük B lenfositlerle karakterize bir neoplazmdır. KLL lösemik faz, SLL ise nodal veya solid faz olarak nitelendirilebilir (1,38,39). Periferik kan, kemik iliği ve lenf nodunda izlenen KLL/SLL'de prolenfositler ve paraimmunoblastlarla iç içe geçmiş monomorfik, küçük, yuvarlak, matür görünümlü B lenfositler dikkat çekicidir (39,40).

2.4.2.Epidemiyoloji

Kronik lenfositik lösemi batı ülkelerinde en sık görülen lösemi türüdür ve %95 oranında B lenfosit kökenli bir hastalıktır. Kuzey Amerika, Avustralya ve Avrupa ülkelerinde yaşayan beyaz ve siyah ırkın, Uzak Doğuda yaşayanlara göre 20-30 kez daha fazla bu hastalığa yakalandığı bildirilmiştir (41,42). Non-Hodgkin lenfomaların %3-10'unu oluşturmaktadır (1,15,21,39). Bütün lenfomalar içinde %16-30 oranında görülmektedir (43).

İleri yaş hastalığı olan KLL'nin en sık görüldüğü yaş aralığı 55-70'tir. Otuz yaş altında oldukça nadirdir. Hastaların %20-30'u 55 yaş altında tanı almaktadır. Toplam insidansı yaklaşık 3-5/100.000/yıl'dır. Erkek/kadın oranı yaklaşık 2/1'dir. Beyaz ırkta daha sık görülür (2,3,4,12,20,34,35,44,45,46).

Kronik lenfositik lösemi riskinin çiftçilerde, kauçuk işçilerinde, asbest ile çalışanlarda ve benzene maruziyette arttığı gözlenmiştir. Diğer lösemilerden farklı olarak, radyasyon öyküsünün etyolojide önemli olmadığı söylenmektedir (4,41). Kimyasal maddeler, diyet, sigara, viral enfeksiyonlar ve otoimmün hastalıklarla etyolojik ilişkisi bulunamamıştır (2,3,4,12,20,34,35,44,45,46).

Kronik lenfositik lösemi'de ailevi yatkınlık gösterilmiş olup, kalıtım şekli bilinmemektedir. KLL hastalarının birinci ve ikinci derece akrabalarında artmış lenfoid neoplaziler ve subklinik monoklonal B hücre artışı tanımlanmıştır (2,3,4,12,20,34,35,44,45,46). Genetik faktörlerin de lösemi gelişmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. KLL ailesel lösemiler içinde en sık rastlanan lösemi türü olup, aynı ailenin değişik bireylerinde KLL saptandığını

bildiren yayınlar mevcuttur (4,41). Birinci dereceden akrabasında KLL saptanan kişilerde, diğer bireylere göre görülme sıklığının 3 kat daha fazla olduğu bildirilmektedir (4).

2.4.3.Fizyopatoloji

Yapılan son çalışmalar KLL'nin immatür B hücrelerinden geliştiği yönündeki klasik bilgilerin aksine, antijenle karşılaşarak aktive olmuş matür B hücrelerinden geliştiğini göstermektedir. Bu dönüşüm sürecinin, olasılıkla, erken ve/veya T hücreden bağımsız immün yanıt aşamasında başladığı düşünülmektedir (45,46). Uzun yıllar boyunca KLL, programlı hücre ölümü sinyal yolağındaki bir sorun nedeniyle yavaş çoğalan B lenfositlerden oluşan bir 'birikim hastalığı' olarak kabul edilmiştir (44,47). Ancak son yapılan çalışmalar ile bu görüşten uzaklaşmış olup, KLL'nin aktif hücre yaşam döngüsünün işlev gördüğü dinamik bir süreç olduğu öne sürülmüştür (48).

Kronik lenfositik lösemi'de artmış proliferasyondan çok defektif apoptozisin varlığı ve öneminden bahsedilmektedir. KLL hücrelerinin yaklaşık %2-5'inin çoğalma aşamasında olduğu tahmin edilmektedir. Dolaşımdaki KLL hücrelerinin çoğu hücre döngüsünün G0 evresindedir. Kemik iliği, dalak ve lenf nodlarında bulunan yüksek çoğalma hızına sahip hücreler dolaşıma hücre akışını sağlamaktadır. Dokularda çoğalan KLL hücrelerinin oluşturduğu proliferasyon bölgeleri birikim bölgesine kaynak oluşturmaktadır (4,45,49).

Kronik lenfositik lösemi'de hücre yaşam döngüsünün sürmesinde mikroçevrenin katkıları üzerinde durulmaktadır (45,49). Yapılan çalışmalarda, KLL hastalarında kemik iliği ve lenf nodlarında damarlanmada ve yeni damar oluşumunda artış gözlenmiştir. Damarlanma artışının derecesi ile klinik evre arasında ilişki saptanmıştır (15,50,51).

Kronik lenfositik lösemi gelişiminde apoptozis direnci ve bcl-2 protein ailesi önem taşımaktadır. Bcl-2 ökaryot hücrelerde apoptozisi inhibe ederek hücre yaşamını uzatmaktadır. Bcl-2 proteinlerinin KLL hücrelerinde yüksek oranda sentezlendiği gösterilmiştir (52,53). KLL hücrelerindeki artmış bcl-2 sentezinin gen promotor bölgesindeki DeoksiriboNükleik Asit (DNA) hipometilasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (15,49,50).

Kronik lenfositik lösemide BCR sinyal ağı ve antijenik uyarım önemli rol oynamaktadır (54,55). Düşük BCR sentezi KLL hücrelerinin tipik özelliğidir. Ancak hücre zarı düzeyinde yetersiz BCR sentezine karşın, hücre içi BCR yolağında, transkripsiyon ve sentez aşamalarında sorun olmadığı görülmüştür (4,56).

Kronik lenfositik lösemi'de IgVH mutasyon durumu ilk kez tanımlandığında, biyolojik davranış farkı nedeniyle KLL iki ayrı hastalık gibi ele alınmıştır. Ancak son yapılan çalışmalar, KLL hücrelerinin, IgVH mutasyon durumundan bağımsız olarak, bellek hücrelerine benzer gen

profiline sahip tek bir kök hücreden geliştiğini desteklemektedir. IgVH mutasyonu olan KLL (Mutated KLL, M-KLL) hücreleri anerjik iken, IgVH gen mutasyonu olmayan KLL (Unmutated KLL, U-KLL) hücreleri yeterli BCR sinyal kapasitesine sahiptir (54,55,57). U-KLL olgularında BCR sentezi göreceli olarak yüksektir ve bu hücreler antijenik uyarıya daha iyi yanıt vermektedir (4,56). Bu nedenle U-KLL olgularının prognozu kötüdür (57).

Zeta zinciri ilişkili protein kinaz 70 (ZAP70), reseptör bağımlı bir tirozin kinaz proteindir. T ve NK hücrelerinde bulunurken, dolaşımdaki normal B hücrelerinde bulunmaz. U-KLL hücrelerinde ZAP70 sentezi yüksektir. ZAP70 pozitif KLL hücrelerinde BCR'nin uyarılması sonucunda artmış tirozin kinaz fosforilasyonu ve hücre içi kalsiyum serbestleşmesi gerçekleşmektedir. Dolayısıyla ZAP70, KLL hücrelerinde BCR sinyal yolağını aktifleştirerek yaşam süresini uzatmakta ve hastalık seyrini hızlandırmaktadır (4,45).

BCR sinyal yolunun diğer önemli molekülü neoplastik klonun çoğalmasından sorumlu olan CD38'dir (54,55). CD38, B hücre gelişiminin farklı aşamalarında önem taşımaktadır. CD38 ekspresyonu, U-KLL ile ilişkili olup kötü prognozu göstermekte ve hücre yaşam süresini uzatmaktadır (4).

2.4.4. Klinik özellikler

Kronik lenfositik lösemi primer olarak ileri yaş grubu hastalığıdır ancak genç yetişkinlerde de tanımlanmıştır (58,59). Akut löseminin belirti ve semptomlarından farklı olarak KLL yavaş gelişir. Vakaları %25'i asemptomatiktir. KLL'nin asemptomatik fazının süresi hastadan hastaya değişkendir. Tanı herhangi bir nedenle yapılan tetkiklerde lenfositozun saptanması ve ardından gerçekleştirilen incelemelerle konur (59).

Kronik lenfositik lösemi'nin hematolojik anormallikleri periferik kan ve kemik iliği lenfositozisi ile karakterizedir (59). Lenfosit sayısı $<10 \times 10^9/L$ olduğunda ise tanı için KLL immünofenotip ve morfolojisi ile tipik görünümün olması şarttır (30). Anemi meydana geldiğinde genellikle normokromik ve normositiktir (59). Lenf nodu, karaciğer ve dalak diğer tipik tutulum alanlarıdır. Dalak tutulduğunda boyutu büyümüş, genişlemiş ve ağırlığı artmış olabilir. Bunların dışında deri, akciğer, meme ve oküler adneks gibi ektranodal tutulum alanları olabilir (30).

Hastaların büyük çoğunluğunda açıklanamayan persistan lenfositozis, servikal, supraklavikular ve/veya aksillar nodlarda hafif lenfadenopati ve splenomegali KLL'nin erken belirtileri olarak görülür. Hafif anemi ve trombositopeni hastalığın daha erken evrelerinde yaygındır (59). Hastaların %5'inde nodüler ve diffüz deri infiltrasyonları, eritroderma, ekfoliyatif dermatit ve sekonder deri enfeksiyonlarının formları halinde kutanöz invazyon bulguları görülür (59,60).

Hastalık ilerledikçe splenomegali, hipersplenizm ve bunu takiben periferel sitopenilerle giden masif adenopatiye yol açan organ infiltrasyonları meydana gelir. Bu hastalarda ateş, kilo kaybı ve gece terlemelerini içeren B semptomları bulunur. Hastalığın devamında kemik iliği neoplastik hücrelerle büyük ölçüde infiltre hale gelir ve tümör hücrelerinin ilik elemanları ile yer değiştirmesine bağlı olarak daha ciddi anemi, trombositopeni ve nötropeni meydana gelir (59).

Kronik lenfositik lösemi’li hastalarda immünolojik aktivite önemli ölçüde bozuktur. Hipogammaglobulinemi KLL’li hastaların yaklaşık %50’sinde görülür. Ig yetersizliği çeşitli enfeksiyonların gelişiminde artışa sebep olur. Özellikle respiratuar sistem, üriner sistem ve deride görülen bakteriyel enfeksiyonlar, Herpes simpleks ve Herpes zoster gibi viral enfeksiyonlar yaygındır ve dramatik olarak hastanın morbidite ve mortalitesine katkıda bulunur (59). Enfeksiyon en önemli komplikasyonlardan olup; en sık ölüm nedenlerinden biridir (1).

Otoimmünite KLL’de sıklıkla görülür. Hastalığın seyri boyunca Coombs pozitif otoimmün hemolitik anemi gelişen hastaların oranı %25’tir. Kırmızı kan hücrelerine karşı üretilen ve direkt antiglobulin (Coombs) testi ile saptanan antikorlar önce görülebilir, simültane olarak ya da KLL’nin takibinde meydana gelebilir (59). Kırmızı hücre aplazisi nadiren meydana gelir (59,61). Trombosit ve nötrofillere karşı antikorlar gelişebilir ve immün trombositopenik purpura ve nötropeniye yol açabilir. Bence Jones paraproteinemisi KLL’li hastaların % 65’inde rapor edilmiştir. Ağır zincir paraproteinler IgM ya da IgG saptanabilir (59).

Kronik lenfositik lösemi’de tedaviden bağımsız olarak ikinci bir kanser sıklığında artış mevcuttur (49). Erken evre hastaların tedavi edilmesinin sağkalım üzerine etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle genel görüş ileri evre ve semptomatik hastalığın tedavi edilmesi yönündedir (62). KLL’nin klinik seyri çok değişkendir ve bireysel prognoz değerlendirmesi bu nedenle önem taşımaktadır (11,34,36,44,52,56,62,63).

2.4.5. Tanı kriterleri

Kronik lenfositik lösemi’nin tanısı Uluslararası Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute- Sponsored Working Group, NCI-WG) tarafından önerilen ve revize edilen kriterlere dayanmaktadır (64) (Tablo 2). Tanı için diğer sebeplerin yokluğunda matür görünümlü lenfositlerden oluşan persistan (>1 ay) periferel kan lenfositozisi ($>5 \times 10^9$ hc/L) ve dolaşımdaki lenfositlerin KLL immünfenotipinde olması (periferel kanın flow sitometrik immünfenotipik analizi ile gösterilen soluk CD20+, CD19+, CD5+, CD23+, FMC7-, Zayıf yoğunlukta yüzey Ig’leri) gerekir (59).

Çoğu KLL vakasında görülen lenfositlerin morfolojik özellikleri oldukça belirgin olmasına rağmen; kesin tanı için neoplastik hücrelerin membran immünfenotipi muhakkak

saptanmalıdır (65). Tipik bir KLL vakasında neoplastik hücrelerde CD5, CD11c, CD19 (soluk), CD20 (soluk), CD23, CD22 (zayıf ya da negatif) ve monoklonal kappa ya da lambda Ig hafif zincir ekspresyonları gösterilebilir. Bu hücreler FMC7 ve CD79b için negatiftirler (59).

Tablo 2: Kronik lenfositik lösemide tanı kriterleri

Kronik lenfositik lösemi’de National Cancer Institute Working Group (NCI-WG) tanı kriterleri
1- Çevre kanında 1 aydan uzun süren, $>5 \times 10^9/L$ oranında, olgun görünümlü lenfosit artışının olması
2- Monoklonal B hücre fenotipi (düşük sIg, CD5 sentezi)
Kronik lenfositik lösemi hücresinin immunfenotipik özellikleri
CD5+/CD19+, CD23+, CD79a+, CD43+, CD11c+
Kappa + veya lambda +
Düşük ifadelenen moleküller: sIg, CD79b, CD20 ve CD22 FMC7-, CD10-, siklinD1-

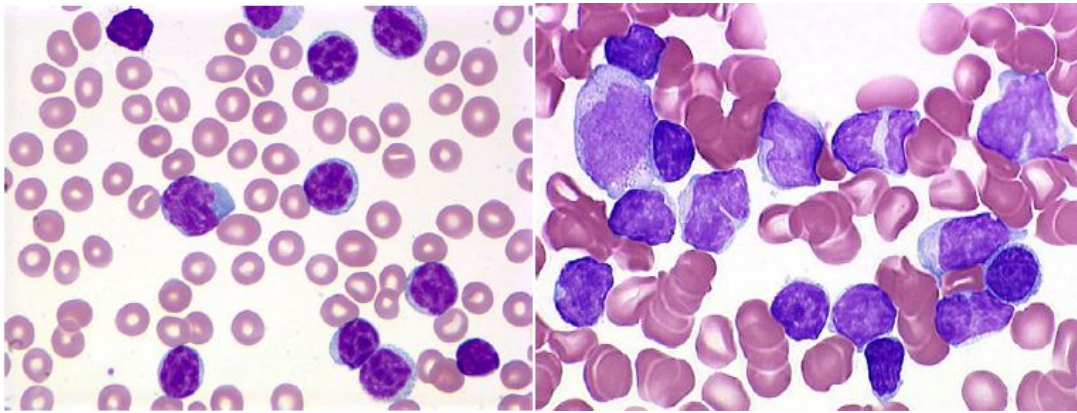
Kemik iliğinde lenfosit infiltrasyonunun gösterilmesi (bütün nükleuslu hücrelerin %30’undan fazlasının lenfosit olması) tanı için gerekli değildir. Fakat kemik iliğinin incelenmesi evrelemede ve vakaların tedaviye cevabının takibinde esansiyeldir. Kemik iliği biyopsisi tanı için gerekli olmamasına rağmen, infiltrasyonun diffüz ya da non-diffüz paternde olmasının bilinmesi prognostik belirleme için değerlidir. Çeşitli çalışmalar KLL’de kemik iliği infiltrasyon paterninin prognostik önemini ve diffüz tutulumun kısa sağkalım ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu göstermiştir (59).

2.4.6. Morfolojik kriterler

Periferik kan incelemesi:

Kronik lenfositik lösemi’de karakteristik olarak kan yaymasında monoton lenfoid hücre popülasyonunun baskın olan, genellikle 5000 μL ’den daha fazla lenfositozis ortaya çıkar. KLL vakalarının yaklaşık % 6’sında lenfosit sayısı 5000 μL ’den azdır ve KLL’ye ait klinik belirtiler yoktur. Bu gibi vakalarda total diferansiyel sayının %50’ye eşit ya da %50’den fazla olduğu rölatif lenfositozis, immünofenotipleme ve kemik iliği biyopsisi ile birlikte KLL’nin araştırılmasında ipucu olarak kullanılabilir (59,66). Kemik iliği ve periferik kanda KLL hücreleri, dar, bazofilik sitoplazmalı, kümelenmiş kromatin paternine sahip, düzgün sınırlı küçük lenfositlerdir. Nükleolus yoktur veya belirsizdir (39,41).

Kronik lenfositik lösemi’de lenfositler morfolojik olarak değişkendir (59). Bazı KLL olguları atipik morfoloji gösterebilir (Resim 1). Bu olgularda değişen oranlarda atipik lenfositlere rastlanabilir, ancak immünofenotipleri KLL için karakteristik özelliklere sahiptir (30). Büyük belirgin nükleolusa sahip prolenfositlerin oranı, yayma preparatlarında %2’den azdır. Prolenfositler küçük lösemik hücrelerden (9-10 μm) daha büyüktür, daha geniş sitoplazmalı, belirgin santral nükleuslu, kondanse kromatinli ve yuvarlak nükleusludur (59). Sayılarının artışı agresif bir klinik seyir, p53 anormalliği ve kromozom 12 trizomisi ile ilişkilidir (30). KLL’li hastaların yaklaşık %15’inde atipik morfolojik özellikler görülür. Dolaşımdaki prolenfositlerin sayısının artması (>%10) ile karakterize atipik morfolojik özellikler mevcutsa bu prolenfositli KLL (KLL/PL), dolaşımdaki lenfoplazmositik ve çentikli hücrelerin artması (>%15) söz konusu ise bu atipik KLL olarak adlandırılır (59,67).



Resim 1: KLL’de periferik kan incelemesinde görülen lenfoid hücreler: a) Tipik lenfositler (H&E, x1000) b) Atipik lenfositler (H&E, x1000) (59).

Kemik iliği:

Kronik lenfositik lösemi’de lenfositlerin morfolojisi kemik iliği aspirasyonları ve biyopsi spesmenlerinde de incelenebilir. Kemik iliği aspirasyon yaymaları kemik iliğindeki bütün nükleuslu hücrelerin %30 ve fazlasını içeren bir lenfositozis olduğunu gösterir (59). Kemik iliği tutulumu nodüler, interstisyel, diffüz veya her üçünün kombinasyonu (mikst) şeklinde olabilir (41, 68) (Şekil 2).

Nodüler patern ilik mesafesi boyunca dağılmış küçük lenfositlerin agregatları ile karakterizedir. Kemik iliğinin benign lenfoid agregatlarına zıt olarak KLL’nin nodüler agregatları daha az kompakttır ve nodül çevresini infiltre eden neoplastik lenfoid hücreler ile düzensiz sınırlara sahiptirler. Psödofoliküler gelişim merkezi olarak bilinen proliferasyon merkezlerinin gelişimi geniş tutulumlu vakalarda görülebilir (59).

İnterstisyel paternde kemik iliği çatısı bozulmaksızın lenfositler normal hematopoietik elementlerle karışık halde bulunur (59, 68).

Diffüz gelişim paterninde yağ hücrelerini de içeren tüm ilik alanının neoplastik lenfoid hücre infiltratı ile tabaka halinde kaplandığı görülür (59, 68).

Normal



İnterstisyel



Nodüler



Diffüz



Şekil 2: KLL’de kemik iliği infiltrasyon paternleri (68)

Kemik iliği tutulum paterni prognoz ile ilişkili olup, nodüler ve interstisyel patern erken dönem KLL’de izlenir. İlerlemiş ve kemik iliği yetmezliği gelişmiş hastalarda infiltrasyon genellikle diffüz paterndedir (30). Diffüz ve diffüz olmayan paternler ZAP70 ekspresyonu ve IgVH mutasyon durumu ile ilişkilidir. Nodüler patern infiltrasyonlu KLL vakaları somatik olarak hipermutasyonludur ve ZAP70 eksprese etmezler. Buna rağmen diffüz tutulumda mutasyonsuz IgVH geni vardır ve ZAP70 ekspresyonu görülür (59,69).

Lenf nodu:

Kronik lenfositik lösemi primer’de periferik kan ve kemik iliği primer olarak tutulmakla birlikte lenf nodu tutulumu da oldukça yaygındır (59). KLL ile tutulmuş olan lenf nodu normal boyutta olabilir, ancak sıklıkla büyümüştür. Lenf nodu makroskopik olarak sert, beyaz, balık eti görünümündedir. Tümör çevre yumuşak dokuya yayılım gösterebilir. Ekstranodal tutulum alanlarında da benzer görünüm mevcuttur (39).

Mikroskopik incelemede lenf nodunun olağan histolojik yapısı bozulmuştur. Koyu, küçük lenfositlerin bulunduğu zeminde büyük hücreleri içeren soluk görünümlü, psödofolikül yapıları izlenebilir. Hastaların %75’ten fazlasında lenf nodunun normal histolojik yapısı tamamen silinmiş görünümündedir. Bazı hastalarda lenf nodunun periferinde rezidüel lenfoid doku alanları görülebilir. Tutulum nadiren interfoliküler olabilir (59).

İnterfoliküler patern kemik iliğinden ziyade daha yaygın olarak lenf nodlarında görülür (59,70). Bu paternde periferik mantel zondan yoksun geniş paratrabeküler ve interstisyel reaktif germinal merkezler görülür (59).

Neoplastik hücreler küçük, matür görünümlü lenfosit benzer. Hücre boyutu 6-12 µm ve morfolojik olarak normal görünümde olup, transforme olmamış lenfosit formundan ayırmak olanaksızdır. KLL’de sitoplazma genellikle dardır, geniş sitoplazma plazmasitoid varyantta görülür. Hücresel proliferasyon monotondur, bazen hastalarda malign lenfoid hücrelerin heterojen popülasyonu görülebilir. Nükleus yuvarlaktır, hafif nükleer membran kontür düzensizliği vardır ve birkaç küçük nükleolus gözlenebilir. Mitotik aktivite düşüktür. Proliferasyon merkezleri olarak da bilinen psödofoliküller küçük, orta ve büyük boy hücreler içerir. Prolenfositler orta boyda dağılmış kromatin ve küçük nükleolusa sahip iken, paraimmünoblastlar yuvarlak veya oval nükleuslu, kromatin dağılımı gösteren, santral eozinofilik nükleolus ve hafif bazofilik sitoplazmaya sahip orta-büyük boy hücrelerdir. Psödofoliküllerin boyutu ve paraimmünoblastların sayısı olgudan olguya değişiklik gösterir (59).

Bazı vakalarda açık olarak lösemik faz olmaksızın doku tutulumu meydana gelir. Bu gibi durumlarda Small Lymphocytic Lymphoma (SLL) terimi kullanılır (59). SLL KLL’nin nodal

karşılığıdır (65). SLL’de esas olarak lenf nodları ve ektranodal dokular tutulur. Bu küçük B lenfositlerin neoplastik transformasyonu ile karakterize diffüz Non-Hodgkin Lenfomadır. Lenf nodunda SLL’nin hücresel komponentleri küçük lenfositler, prolenfositler ve paraimmünoblastlardır. Prolenfositler ve paraimmünoblastlar genellikle psödofoliküllerde konsantredir (65). SLL vakalarının 2/3’ü lenf nodunda lokalize kalır fakat bazı vakalarda periferik kan tutulumuna ilerler. O zaman hastalık KLL/SLL olarak tanımlanır. Şimdilerde bu iki antite tek bir hastalığın farklı doku ekspresyonları olarak dikkate alınmaktadır (59,71).

Plazmasitoid diferansiyasyon nadir olmasına rağmen KLL’de rapor edilmiştir ve bu hastalarda sıklıkla serum monoklonal paraprotein olarak genellikle IgM mevcuttur (59,72). Bu gibi vakalarda Lenfoplazmositik lenfoma/Waldenstrom’s makroglobulinemi- si’nden farklı olarak KLL’nin bütün morfolojik ve immünofenotipik özellikleri bulunur. Literatürde lenf nodu histolojisi ile klinik gidiş arasında ilişkiyi gösteren net bir çalışma yoktur (59).

Diğer organlar:

Dalak, kemik iliği ve lenf nodundan sonra KLL tutulumunun en yaygın görüldüğü organdır (59). Dalakta beyaz pulpa tutulumu belirgindir, ancak kırmızı pulpa da tutulabilir (73). Kırmızı pulpanın geniş infiltrasyonu, diffüz tutulumda yaygındır (59). Psödofoliküller görülebilir, ancak lenf nodlarında görülen kadar belirgin değildir (41). Lenf nodu ya da kemik iliği tutulumu yokluğunda izole splenik tutulumun olduğu nadir vakalar raporlanmıştır ve bu hastalar daha iyi prognozlu olmaya eğilimlidir (59).

Karaciğer infiltrasyonunda KLL hücreleri primer olarak sinüslerin tutulması ile portal alanlar etrafında konsantredir (59).

Diğer ektranodal ve ekstramedüller tutulum alanları tonsil, deri (74), gastrointestinal sistem (75) ve plevradır (76). Myokard infarktüsünün sebebi olarak koroner arterlerin oklüzyonu tek bir vakada rapor edilmiştir (77).

Neoplastik hücreler ince iğne aspirasyon materyallerinde ve imprint preparatlarında, küçük, transforme olmamış lenfositlere benzer morfolojidedir . Hücreler soluk bazofilik, dar sitoplazmaya sahiptir. Doku kesitlerinde olduğu gibi nükleusta birkaç belli belirsiz nükleolus ve kromatin kümelenmesi görülür. Psödofoliküler proliferasyon merkezlerinin çokluğuna bağlı olarak değişik sayıda prolenfosit ve büyük transforme hücreler (immünoblastlar) görülebilir. Bu hücreler KLL hücrelerinden daha geniş sitoplazmaya sahiptir. Bu transforme hücreler bir veya daha fazla belirgin nükleolus içerir, ancak sitoplazmik bazofili görülmez. Mast hücreleri artmış ve plazma hücreleri sıklıkla azalmıştır (41).

2.4.7.İmmünfenotipik özellikler

Tipik bir KLL vakası genellikle tanımlanabilir ve sadece morfolojik özelliklere dayanarak subklasifiye edilebilir. B hücre monoklonal antikorlar kullanılarak neoplazmin immünfenotipik karakterizasyonu tanıyı doğrular (59).

Kronik lenfositik lösemi'nin kendine özgü bir immünprofili vardır. Lösemik B hücreler, matür B hücrelerdeki gibi CD19 yanı sıra, daha az oranda CD20 ve beraberinde CD5 ekspresyonu gösterirler. Ayrıca CD23, CD43 pozitif; CD79b zayıf pozitif veya negatif, FMC7, CD10 ve siklin D1 negatif immünfenotip sergiler. Neoplastik hücreler, normal B lenfositlerin ancak %10'u kadar yüzey Ig dansitesi gösterdiğinden, özellikle IgM ve IgD olmak üzere, zayıf yüzey Ig ekspresyonu gösterirler (39,41). Olguların % 60-75 kadarında CD21 yanı sıra CD11c, CD25 ve CD14 ekspresyonu gözlenebilir (30,39). CD5+ ve CD23+ fenotip KLL tanısı için esansiyeldir. Zayıf CD20 ekspresyonu KLL tanısını desteklemede yararlı bir özelliktir (59) (Tablo 3).

Tablo 3: Kronik lenfositik lösemide immünfenotipleme

Kronik lenfositik Lösemide İmmünhistokimya		
Pozitif (+)	Pozitif/negatif (+/-)	Negatif (-)
CD5	CD11c	FMC7
CD19	CD25	CD10
CD20	CD79b	Siklin D1
CD23	IgM/IgD	CD22
CD43	CD21	CD32
CD79a	CD14	

Kronik lenfositik lösemi'yi diğer B hücreli lenfoproliferatif hastalıklardan ayırmak için; KLL'nin immünfenotipik markerlarının ekspresyon paternlerine dayanan bir uluslararası skorlama sistemi (International scoring system) meydana getirilmiştir. Bu sisteme göre KLL'de 5 immünfenotipik marker değerlendirilmiştir: sIg, CD5, CD23, FMC7 ve CD79b (ya da CD22). Skor CD5 (1 puan), CD23 (1 puan), düşük seviyede yüzey Ig (1 puan) ekspresyonu ve CD79b (1 puan) (ya da CD22) ya da FMC7 (1 puan) yokluğuna dayanmaktadır. Skoru 4 ya da 5 olan vakalar tipik KLL olarak değerlendirilir. Skoru 3 ve daha az olanlar atipik KLL olarak dikkate alınır (59,78) (Tablo 4).

Tablo 4: Kronik lenfositik lösemide immünofenotipik skoring sistemi

Kronik Lenfositik Lösemide uluslararası skoring sistemi		
Markerlar	1 puan	0 puan
CD5	Pozitif	Negatif
CD23	Pozitif	Negatif
FMC7	Negatif	Pozitif
sIg	Zayıf	Orta/güçlü
CD79b (yada CD22)	Zayıf/ negatif	Orta/güçlü
4, 5 puan= Tipik KLL	1,2,3 puan= Atipik KLL	

Kronik lenfositik lösemi’de CD5’in aberan ekspresyonu ilgi çeken bir konudur. CD5 normalde T lenfositlerde ve kord kanı eritrositleri gibi hücrelerde bulunur. CD5 molekülünün tam fonksiyonel rolü bilinmemektedir. KLL’nin aberan antikor üretiminin bir sonucu olarak normal CD5+ B hücrelerinden geliştiği öne sürülmektedir (59,79). CD5 ekspresyonunun B hücrelerinin yüzeyinde mitojenik stimülasyon ile indüklenebildiği bulguları ışığında bu görüş daha kabul görür hale gelmiştir (59,80). Ayrıca, post-germinal merkez hücresi için karakteristik, somatik olarak mutasyonlu IgVH gen ile KLL’nin farklı bir subtipinin tanımlanması, CD5+ saf B hücrelerini daha az cazip bir aday haline getirmiştir (59,81). KLL’de % 7-20 oranında CD5 ekspresyonu görülmez (59,82). CD5 negatif olan KLL olgularında genellikle splenomegali, anemi ve lenf nodu tutulumunun yokluğu ile hastalığın daha hafif bir formu görülür ve böylece olgular daha iyi prognozlu olmaya eğilimlidir (59,83). Plazmasitoid diferansiyasyon CD25, CD71 ekspresyonu ve CD5 negatifliği ile birliktedir (39).

Kronik lenfositik lösemi hücrelerinde CD23 ekspresyonu da ilginçtir (59). CD23 IgE’nin düşük afiniteli bir reseptörü olarak fonksiyon gören 45 kd ağırlığında bir transmembran glikoproteinidir. CD23 normal B hücrelerinde düşük seviyelerde eksprese edilir fakat aktivasyon üzerine B hücrelerinde yüksek ekspresyon görülür. KLL olgularında CD23’ün yüksek seviyeleri hastalık aktivitesi ile direkt olarak ilişkilidir (59,84). CD23 ve siklin D1, KLL ile mantle hücreli lenfoma ayrımında önemlidir. Bazı olgularda CD23 negatif veya fokal pozitifdir ve bazı mantle hücreli lenfomalar CD23 eksprese edebilirler. Bu durumda siklin D1 ayırıcı tanıda yardımcı olur (30).

FMC7 multimerik CD20 kompleksine bağlanan 105 kd ağırlığında bir glikoproteindir. Normal ve malign B hücrelerinde CD20 ve FMC7 ekspresyonu arasında güçlü bir korelasyon vardır (59,85). FMC7 çoğu KLL vakasında genellikle eksprese edilmezken, diğer B hücreli

hastalıklar sürekli olarak FMC7 eksprese eder. KLL vakalarının küçük bir kısmında FMC7 pozitifdir ancak bu vakalar aynı zamanda güçlü CD20 ve sIg ekspresyonu ile giden atipik morfoloji gösterirler. Klinik olarak bunlar FMC7 negatif vakalar ile karşılaştırıldığında daha agresif bir seyir gösterirler (59,86).

Aynı zamanda B29 olarak da bilinen CD79b, KLL vakalarında oldukça az eksprese edilen ya da sürekli olarak negatif olan bir diğer B hücre markerıdır. Bu markerın ekspresyon seviyesi KLL’de Ig’nin ekspresyon seviyesi ile direkt olarak koreledir (59,87). CD79b’nin ve sonuç olarak Ig’nin az ekspresyonu ya da yokluğu, KLL hastalarında B29 genini kodlayan sekanslarda mutasyonların gelişmesine bağlanmıştır (59,88). KLL’ye zıt olarak diğer çoğu B hücreli neoplazmlarda CD79b pozitifdir. Literatürde KLL’de CD79b ekspresyonu %5-27 oranında raporlanmıştır (59,87,89). Geçmişte CD79b ekspresyonunun atipik morfolojik özellikler ile ilişkili olduğu raporlanmıştır fakat bu bilgi herhangi bir ilişki olmadığını raporlayan bağımsız araştırmalarla çelişmektedir (59,89).

CD38 ve ZAP70 ekspresyonunun KLL’nin tanısından ziyade prognozunun belirlenmesinde rolü vardır (59).

Kronik lenfositik lösemi’de apoptozise direnç neoplastik hücrelerin esas işaretidir. Bu açıdan KLL’de bcl-2 ailesinin ekspresyonu önemlidir. Altta yatan mekanizmalar hala anlaşılamamış olsa da, bütün KLL vakalarında bcl-2 aşırı derecede eksprese edilir (59,90). Bcl-2’ye ek olarak, Bax ve bcl-xl ‘de aynı zamanda aşırı eksprese edilir ve KLL hücrelerine apoptozis direncini sağlarlar (59,91). Yeni bir çalışmada bcl-2 ailesinin diğer bir antiapoptotik üyesi olan mantle cell lymphoma-1 (MCL-1)’in KLL’de aşırı eksprese edildiği ve sitotoksik tedavi yetmezliğine katkıda bulunduğu ortaya konmuştur (91).

B1-integrinler, B2-integrinler ve selektinleri içeren çeşitli hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonlarındaki anormallikler ve proteinlerden Ig süper gen ailesi, KLL’nin biyolojik davranışını anlamak ve aynı zamanda farklı hücre adezyon moleküllerinin fenotipik profillerinin prognostik önemini saptamak için araştırılmıştır (59,92). B-integrinler diğer B-hücreli neoplazmlar ile karşılaştırıldığında KLL’de genellikle az eksprese edilir. CD49d/CD29’un ekspresyonu özellikle ilerlemiş klinik evre ile ilişkili bulunmuştur. Yoğun CD49d ekspresyonu masif lenfadenopati ve splenomegalili KLL hastalarında gözlemlenmiştir (59,93).

CD11a/CD18’in azalmış ekspresyonu KLL’nin karakteristik bir özelliğidir ve sıklıkla CD11a/CD18 pozitif olan diğer B hücreli lenfomalardan ayırma izini verir (59,94). İlave olarak CD11c/CD18, CD31, CD48 ve CD58’i içeren integrin ailesinin diğer üyeleri de özellikle 11q23 kromozom anormallikleri taşıyan KLL hastalarında az eksprese edilir (59,95). Ig süpergen ailesine mensup 90 kd’luk bir protein olan intersellüler adezyon molekülü 1’in (CD54) serum seviyeleri,

sağlıklı olanlarla karşılaştırıldığında KLL hasta- larında önemli ölçüde artar ve KLL'nin ilerlemiş klinik evresinde hepatosplenomegali ve tümör yükü ile pozitif olarak ilişkilidir (59,93,96). Benzer olarak CD44 ve CD62L (L-selektin) güçlü ekspresyonları KLL'nin progresyonu ve kısa sağkalım ile koreledir (59,97).

Kronik lenfositik lösemi ve küçük lenfositik lenfoma arasındaki bilinen tek immunolojik fark, küçük lenfositik lenfoma hücrelerindeki bir yapışma molekülü olan lenfosit fonksiyon ilişkili antijen (LFA-1) ekspresyonudur (39).

2.4.8.Sitogenetik ve moleküler özellikler

B hücreli lenfomaların karakteristik özelliği klonal Ig yeniden düzenlenimini gösteren B hücrelerden köken almasıdır. KLL görece matür B lenfositlerden kaynaklandığı için, hem Ig ağır zincir, hem de hafif zincirlerinde yeniden düzenlenim dikkat çekicidir (39,41). Olguların yaklaşık %8'inde T hücre reseptör β zincir gen lokusunda yeniden düzenlenim izlenir. Yüksek dereceli B hücreli Non-Hodgkin lenfomaların tersine KLL'de somatik hipermutasyonlar görülmez (39).

Olguların üçte ikisinde MYC düzeylerinde, üçte birinde ise RAS düzeylerinde artış gözlenmiştir. Bu artışa karşın onkogenlerde mutasyon olmayabilir. ABL düzeylerinde artış olguların %29'unda, plazmasitoid varyant görülen olguların ise %46'sında izlenmektedir. ABL düzeylerinde artış agresif bir klinik seyir ile ilişkilidir. p53 aşırı ekspresyonu olguların yaklaşık % 20'sinde izlenir ve bu ekspresyon p53 geninde mutasyon sonucu gerçekleşir. SRC protoonkogen aktivitesi KLL'de düşüktür. 13q12.3 sitogenetik anomalisi BRCA-2 gen inaktivasyonu ile ilişkili olabilir (39).

Kronik lenfositik lösemi olgularında sitogenetik değerlendirmede nadiren t(14;18) translokasyonu bulunur. KLL'lerin çoğunda bcl-2 protein ekspresyonu miktarı artmıştır. SLL'de küçük hücrelerde görülmeyen retinoblastom protein ekspresyonu psödofoliküllerde yer alan hücrelerde görülebilir. Epstein-Barr virüsü (EBV), KLL'nin küçük neoplastik hücrelerinde görülmez, ancak Hodgkin lenfoma veya yüksek dereceli non-Hodgkin lenfomaya transformasyon ile ilişkili olabilir (39).

Olguların çoğunda, hücrelerin %5'ten azı S fazındadır ve hücrelerin küçük bir fraksiyonu Ki-67 proliferasyon proteini eksprese eder. Ki-67 'nin ekspresyonu sıklıkla küçük neoplastik hücrelerden çok psödofoliküler proliferasyon merkezlerinde izlenir. Olguların yaklaşık %90'ı diploiddir (39).

2.4.9. Prognoz ve belirleyici faktörler

Kronik lenfositik lösemi, klinik gidişi oldukça değişkenlik gösteren bir hastalıktır . Sağkalım süresi bazen aylarla ifade edilse de çeşitli kaynaklarda ortalama 8-10 yıl olarak verilmektedir (1). KLL’li hastalar için ortalama sağkalım 7,5 yıldır; hastaların % 50’si tanıdan sonra 5 yıl yaşarken, % 30’u 10 yıl yaşamaktadır (59,98). KLL asemptomatik bir tutulum ve stabilite ile yavaş seyreden bir hastalık olabilir. Bazı hastaların kliniği oldukça iyidir ve stabil veya yavaş artan lenfositosis nedeni ile tedavi gereksinimi yoktur. Yaşam süresi hastalıktan etkilenmemiş bireylerle benzerdir ancak başlangıç tanısından 10-15 yıl sonra hastalık ilerleyebilir. Buna karşın, KLL’li hastaların yaklaşık %20’sinde çok agresif bir klinik gidiş vardır. İyi prognoz ve tedaviye rağmen hastaların büyük kısmı sonuç olarak bu hastalıktan ölür. Tam kür oldukça nadirdir. Bazı hastalarda artmış lenfosit sayısı, lenf nodu ve dalakta büyüme, anemi ve trombositopeni gelişmesi progresyonu gösterir. Bu hastalara uygulanan erken ve yoğun tedaviye rağmen sağkalım süresi birkaç yıldır. Hastalar arasında görülen bu geniş varyasyonun sebebi tam olarak anlaşılabilmiş değildir (1,59). Tüm bu nedenlerle KLL’li olgularda tanı anında prognostik faktörlerin belirlenmesi hastaya en uygun yaklaşımı sağlar (1).

Tanı anında kullanılabilecek prognostik bir faktör; maliyeti düşük, kalite kontrollü, kolay uygulanabilir ve faz 3 çalışmalarla desteklenmiş olmalı, güncel faktörlere ek katkı sağlayabilmelidir (99). KLL’de kullanılan prognostik faktörler klinik ve biyolojik olmak üzere 2 gruba ayrılır. Bunlar da kendi içinde altgruplara ayrılırlar (Tablo 5).

Tablo 5: Kronik lenfositik lösemi’de kullanılan prognostik faktörler

Kronik lenfositik lösemi’de prognostik faktörler	
Klinik Faktörler	-Klinik evreleme -Lenfosit sayısının ikiye katlanma zamanı -Kemik iliği infiltrasyon paterni
Biyolojik faktörler	-Serum timidin kinaz, -Serum β 2-mikroglobulin düzeyi, -Serum CD23 düzeyi, -Periferel kanda PL’lerin %10’dan fazla olması, -p53 ekspresyonu
Yeni tanımlanan biyolojik faktörler	-IgVH gen mutasyon durumu -CD38 yüzey ekspresyonu -ZAP70 sitoplazmik ekspresyonu -Kromozomal anormalliklerin varlığı
İleri araştırmaya gereksinim duyulan prognostik faktörler	-IL-6,IL-10, TNF-alfa, intraselüler Bcl-2, ICAM1, LDH -Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), anjiogenin, anjiopoetin-2

Klinik prognostik faktörler:

Kronik lenfositik lösemi’nin prognozunu belirlemede yardımcı klinik prognostik faktörler;

- Klinik evreleme,
- Lenfosit sayısının ikiye Katlanma Zamanı (LKZ),
- Kemik iliği infiltrasyon paternidir (59,100).

a)Klinik evreleme

Kronik lenfositik lösemi’de Rai (1975) ve Binet (1981) evreleme sistemleri kullanılmaktadır. Bu evreleme sistemleri oluşturulurken tümör yükü esas alınmıştır (2,99,101,102).

Klinik evreleme sistemi ilk olarak 1975’de Rai ve arkadaşları tarafından lenfadenopati, organ büyüklüğü (dalak ve karaciğer) ve sitopeniler temel alınarak geliştirilmiştir (103) (Tablo 6).

Tablo 6: Kronik lenfositik lösemi’de Rai evreleme sistemi

Evre	Özellikler	Sağkalım
Evre 0 (Düşük risk)	Periferik kan ve kemik iliğinde lenfositoz	12 yıl
Evre 1 (Orta risk)	Lenfositoz + Lenfadenopati	
Evre 2 (Orta risk)	Lenfositoz + splenomegali veya hepatomegali	7 yıl
Evre 3 (Yüksek risk)	Lenfositoz +anemi (<Hb: 11 gr/dl)	
Evre 4 (Yüksek risk)	Lenfositoz + trombositopeni (<100 x10 ⁹ /L)	<3 yıl

Rai evreleme sisteminde Evre 1 grup hastalarda ortalama sağkalım 8-10 yıldır. Rai Evre 2 grup hastalarda bu oran 5-8 yıla düşer (59). Klinik evreye göre prognoz değerlendirmesinin yapılabilmesi için modifiye Rai risk sınıflaması oluşturulmuştur. Orijinal Rai evreleme sistemi 5 gruplu sistemden (0-4) 3 gruplu sisteme değiştirilmiştir. Hastalar düşük risk (Rai Evre 0), orta risk (Rai Evre 1-2) ve yüksek risk (Rai Evre 3-4) olarak gruplandırılmıştır (104). Düşük risk kategorisinde ortalama sağkalım 10 yılın üzerindedir. Orta risk grubunda ortalama sağkalım 7 yıldır. Yüksek risk grubunda ise sağkalım 3 yıldan azdır (59).

Binet ve arkadaşları tarafından 1981 yılında oluşturulan klinik evreleme sistemi lenfoid bölge sayısını, hemogloblin ve trombosit sayılarını temel alır. Tutulan lenfoid bölgeler karaciğer, dalak, inguinal, aksillar ve servikal lenf nodlarını kapsar (59) (Tablo 7).

Tablo 7: Kronik lenfositik lösemi’de Binet evreleme sistemi

Evre	Özellikler	Sağkalım
Evre A	Hb:>10 gr/dl , Plt sayısı:>100.000 mm ³ , tutulan lenfoid bölge:< 2	9 yıl
Evre B	Hb:>10 gr/dl , Plt sayısı:>100.000 mm ³ , tutulan lenfoid bölge:> 2	5 yıl
Evre C	Hb:<10 gr/dl , Plt sayısı:<100.000 mm ³ , tutulan lenfoid bölge:bağımsız	2 yıl

Rai Evre 0 ve Binet Evre A grupları diğer evrelerle karşılaştırıldığında daha iyi prognoza sahiptir (64). Bununla birlikte aynı grupta olup farklı klinik seyir gösteren hastalar da olması nedeniyle, klinik evreleme sistemleri erken evrede tanı konmuş KLL hastalarının hangilerinin daha sonra hızlı seyredeceğini ayırmada yetersizdir (6). Hastaların % 80’inden fazlasına erken evrede tanı konulması klinik evrenin prognozda kullanımını sınırlandırmaktadır (6,105). Bu nedenle sadece klinik evreye dayanarak tedavi kararı verilmemelidir.

b) Lenfosit sayısının ikiye katlanma zamanı

Lenfosit sayısının ikiye katlanma zamanı (LKZ), tümörün çoğalma hızını göstermektedir. LKZ, mutlak lenfosit sayısının ikiye katlanma zamanının ay olarak belirlenmesiyle hesaplanır (10). Çoğalma hızını, basit metotla ölçen yararlı bir prognostik belirteçtir (106). LKZ'nin 6 aydan daha kısa olmasının tedavi endikasyonu olduğu belirtilmektedir (64). LKZ'nin 12 aydan kısa olması kötü prognozu gösterir (12,105). Bir çalışmada, LKZ 12 ay ya da daha kısa olan hastaların ortalama sağkalım süreleri 61 ay iken, LKZ 12 aydan uzun olan hastaların ortalama sağkalım süresine çalışma süresi içinde ulaşamamıştır (ortalama takip süresi, 118 ay). Bu çalışmada, klinik evre ve infiltrasyon tipiyle ilişkili olmasına karşın, LKZ'nin KLL'de bağımsız bir prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (59,100).

Çeşitli çalışmalar da erken evre hastalarda LKZ'nin yararını desteklese de (106), klinik kullanımında önemli bir sorun vardır. LKZ geriye dönük hesaplanır ve zamanla ilgili değişikliklerden tümüyle etkilenebilir (10). Enfeksiyonlar ya da kortikosteroid tedavisiyle lenfosit sayısının değişmesi, LKZ'nin kullanımında güçlük yaratmaktadır (105). Tedavi kararında LKZ'nin temel alınması hızlı seyirli kimi hastalarda tedavinin gecikmesine yol açabilir (107).

c) Kemik iliği infiltrasyon paterni

Yapılan çeşitli çalışmalarda KLL'de kemik iliği infiltrasyonunun histolojik paternlerinin prognostik değeri araştırılmıştır (59). Gray ve ark. (59,108) ilk olarak KLL'de kemik iliği infiltrasyon paternlerinin önemini tanımlamış ve kemik iliğinin lenfositik infiltrasyonunu nodüler, mikst (nodüler ve diffüz) ve diffüz paternler olarak kategorize etmişlerdir. Aynı zamanda bu paternleri sağkalım ile ilişkilendirmişlerdir. İnterstisyel patern daha sonra Rywlin (109) tarafından tanımlanmıştır. Böylece KLL'de kemik iliği infiltrasyonunun prognostik etkisini daha iyi değerlendirmek için; çeşitli araştırmacılar tarafından interstisyel, nodüler, mikst (interstisyel ve nodüler) ve diffüz olmak üzere 4 infiltrasyon paterni tanımlanmıştır (59, 109,110).

Bunlar:

1. Nodüler tip: Bazı alanlarda normal hematopoietik hücrelerin yerini nodüler lenfosit infiltratlar almasına karşın kemik iliğinin normal yapısı korunmuştur.
2. İnterstisyel tip: Lenfositik infiltratlar, hematopoietik hücreler ve yağ alanlarının arasında dağılmış olup; kemik iliğinin normal yapısı korunmuştur.
3. Mikst tip: Nodüler ve interstisyel tipin birlikteliğidir.
4. Diffüz tip: Yaygın lenfosit infiltrasyonu normal kemik iliği yapısını silmiştir (59).

Rozman ve ark. (111) KLL'li 63 vakayı değerlendirmiş, kemik iliğinde interstisyel ve nodüler tutulumlu KLL hastalarının diffüz tutulumlularla karşılaştırıldığında göreceli olarak yaşam ortalamalarının daha iyi olduğunu bulmuşlardır. Gray ve ark.'nın (108) yaptığı 115 hastalık bir çalışmada ortalama sağkalımı göreceli olarak 9 yıl hesaplanan nodüler ve mikst paternli hastalarla karşılaştırıldığında, diffüz paternli hastalarda ortalama sağkalım 2 yıl olarak bulunmuştur.

İnterstisyel, nodüler ve mikst tip sınırlı tutulum olarak gruplandırılmıştır (69). Sınırlı infiltrasyon tipine sahip KLL hastalarında sağkalım daha uzundur (59,111,112). Diffüz infiltrasyon tipi kötü prognozla ilişkilidir (1). Bu infiltrasyon tipleriyle, Rai klinik evrelemesi arasında önemli ilişki mevcuttur. Benzer ilişki Binet evreleme sistemiyle de gösterilmiştir (112).

Biyolojik Prognostik faktörler:

Bazı biyolojik parametreler prognostik önem taşır. En geniş ölçüde çalışılan biyolojik prognostik faktörler şunlardır:

- a) Serum timidin kinaz,
- b) Serum β 2-mikroglobulin düzeyi,
- c) Serum CD23 düzeyi,
- d) Periferik kanda prolenfositlerin %10'dan fazla olması,
- e) p53 ekspresyonu.

a) Serum timidin kinaz

Timidin kinaz (TK), DNA sentezinde rol alan hücresel bir enzimdir (10). TK'ın baskın formu bölünen hücrelerde vardır, bölünmeyen hücrelerde yoktur. Bu yüzden bu enzim proliferatif aktivitenin gösterilmesinde yararlı bir belirteçtir. Tümör kitlesinin ve tümör hücrelerinin çoğalma derecesini yansıttığı düşünülmektedir (113). Erken evre KLL hastalarında, prognozun değerlendirilmesinde yararlı olduğu bulunmuştur (107,114). Önceki çalışmalarda yükselmiş TK seviyelerinin ileri Rai evresi ve progresif hastalık ile korele olduğu rapor edilmiş ve retrospektif analizde yavaş seyirli tedavi edilmeyen hastalar başlangıç serum TK düzeylerine dayanarak 2 prognostik gruba ayrılmışlardır (59).

Serum TK aktivitesi sağkalım ile ters ilişkilidir. Binet Evre A hastalar TK seviyelerine göre sıralandığında, serum TK seviyesi yüksek hastalarda (>7.1 U/L) ortalama progresyon-serbest sağkalım 9 ay iken, serum TK seviyesi düşük hastalarda 49 ay'dır (1,114).

Bir çalışmada mutasyon durumu ve TK arasındaki ilişki raporlanmış ve >15 U/L TK seviyesinin KLL'nin prognostik altgruplarının tanımlanmasına izin veren mutasyonsuz IgVH genlerinin güçlü ve bağımsız bir belirleyicisi olduğu bulunmuştur (59,107). KLL hastalarında

yükselmiş TK seviyeleri mutasyonsuz IgVH genleri, CD38, ZAP70 ekspresyonu ve del 11q23, trizomi 12 ve 17p13'ü içeren orta-yüksek riskli kromozomal anormallikler ile koreledir (59). İlave olarak VH3-21 gen kullanımı olan hastalarda TK seviyeleri daha yüksek olmaya meyillidir. Ayrıca prognostik değişken olarak TK'nın önemi progresyonlu KLL vakalarında devam etmektedir (115).

Diğer çalışmalarda TK seviyeleri ile LKZ, hastalık yükü markerları (ALC) ve hücre turnover markerları (LDH, Serum β 2-mikroglobulin) arasındaki ilişki raporlanmıştır (59,115). TK'nın rutin laboratuvarlarda çalışılmaması klinikte kullanımını sınırlamaktadır.

b) Serum β 2-mikroglobulin düzeyi

β 2-mikroglobulin (β 2MG), nükleuslu hücrelerde bulunan membran bağımlı bir proteindir (44,12,52). KLL hastalarında, hastalık evresi ve tümör yüküyle ilişkili bir belirteçtir. β 2MG düzeylerinin kemoterapiye cevap ve sağkalım ile ters ilişkili olduğu gösterilmiştir (1). KLL'de serum β 2MG düzeyinin prognostik önemi başlangıçta Di Giovanni ve ark. tarafından rapor edilmiş ve tedavi almamış 302 hastada β 2MG'in çok değişkenli analizinde, 5 yıllık sağkalım üzerine güçlü belirleyici etkisi olduğu saptanmıştır (116). Başka bir çalışmada beş yıllık sağkalım, yüksek β 2MG düzeyi olan Rai Evre 1-2 hastalarda 54 ay, normal β 2MG düzeyi olanlarda 116 ay bulunmuştur (10). Buna karşın 106 tedavi almamış hastayla yapılan bir diğer çalışma, β 2MG'in, çok değişkenli analizinde tek başına sağkalım üzerine önemli bir belirleyici etkisi olmadığını göstermiştir (117). β 2MG'in, KLL'de prognostik önemi olsa da bu faktörün klinik evre ve LKZ'ndan bağımsız olduğunu gösterecek ve erken evre KLL hastalarındaki rolünü tanımlayacak ek çalışmalara ihtiyaç vardır (10).

c) Serum CD23 düzeyi

Serum CD23 düzeyi tümör çoğalmasını işaret eder. Yüksek düzeyde ekspresyonu dinlenme fazındaki KLL hücrelerinin G1 ve S fazına geçişini gösterir. Diffüz kemik iliği tutulumu ve kısa LKZ gibi kötü prognostik faktörlerle ilişkisi gösterilmiştir (44,52). KLL'de proliferasyon ve CD23 ekspresyonu arasındaki ilişki Fournier ve ark. tarafından ortaya konmuştur (118). Yaptıkları çalışmada diğer stimülasyonların yokluğunda CD23'ün artmış ekspresyonunun dinlenmedeki KLL hücrelerinin hücre siklusunun G1 ve S fazlarına girişini teşvik ettiğini göstermişlerdir. KLL hastalarında CD23 seviyelerinin diğer B hücreli lenfoproliferatif hastalıklardan oluşan kontrol grubundan 3-500 kat daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (118). Çeşitli çalışmalar, hastalığın aktivitesi, progresyonu ve böylece KLL'nin prognozunda önemli bir belirleyici olarak CD23'ün önemini değerlendirmişlerdir (84,119). Hastalığın aktivitesini

belirlemek için CD23 ekspresyonu klinik gidişatın bir belirleyicisi olarak özellikle KLL'nin erken evrelerinde önemlidir (59,120).

d) Periferik kanda prolenfositlerin %10'dan fazla olması

Yapılan çalışmalarda kötü prognoz işareti olarak değerlendirilmiştir (1).

e) p53 ekspresyonu

p53 ekspresyonu prolenfositik transformasyon ile koreledir (1,14). p53 mutasyonları KLL'li hastaların yaklaşık %10-15'inde görülür (121). p53 mutasyonlarının kazanılması KLL'de geç bir olaydır. Richter transformasyonlu KLL hastalarının %30'undan fazlasında görülür (59,121). KLL'de p53 anormallikleri tanı anında ileri evre, fludarabin ve alkilleyici ajanlara direnç, yüksek insidanslı transformasyon, 1-2 yıl içinde hastalık progresyonu ve kötü klinik gidişat ile ilişkilidir (122,123). KLL'de p53 anormalliklerinin saptanması immünhistokimya veya flow sitometri ile protein seviyesi ve Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) ya da DNA sekansı ile DNA seviyesinin gösterilmesi şeklinde olabilir. Anormalliklerin saptanmasında farklı metodların duyarlılığı ve klinik etkisi çeşitli çalışmalarda değerlendirilmiş ve bütün tekniklerin p53'ü KLL'de tanımlamada ve kötü prognoz markerı olarak belirlemede eşit olduğu gösterilmiştir. p53 delesyonları FISH ile vakaların %10-20'sinde saptanır ve bağımsız olarak KLL hastalarında kötü gidişatı ve kemoterapiye direnci gösterir (123).

p53 protein ekspresyonunun immünhistokimyasal olarak analizinin KLL'de prognostik önemi vardır. KLL'de erken evre tümör hücrelerinde kısa yaşam söz konusudur (124). Mutasyonlu p53'ten protein üretimi olduğunda hücrelerde uzamış yaşam süresi vardır. Böylece p53'e karşı monoklonal antikor kullanarak immünhistokimya ile p53 ekspresyonu saptanabilir (125). p53 pozitifliği KLL'de bağımsız prognostik faktördür ve ilerlemiş hastalık, tedaviye direnç ve düşük sağkalım ile ilişkilidir (125,126). Flow sitometrik immünfenotipik analiz ile p53 ekspresyonu FISH'den daha sensitif ve spesifiktir. Flow sitometri KLL hastalarında progresyon ve ileri evreye bağlı olarak hastalığın altgruplarını belirlemede efektif bir görüntüleme tekniğidir (127).

Yeni tanımlanan biyolojik prognostik faktörler

Kronik lenfositik lösemi'de prognostik altgrupları tanımlamak için son yıllarda yapılan çalışmalarda çok sayıda yeni biyolojik faktör ortaya konmuştur. Bunlardan sadece birkaçının KLL'de riski belirlemede bağımsız prognostik değeri olduğu kabul edilmiştir.

Bunlar;

- a) IgVH mutasyon durumu,
- b) CD38 ekspresyonu,
- c) ZAP70 ekspresyonu,
- d) Kromozomal anormalliklerin varlığıdır (1,128).

a) IgVH mutasyon durumu

Kronik lenfositik lösemi hastalarının yaklaşık %50'sinde Ig ağır zincirlerinin değişken bölgelerinde somatik hipermutasyon saptanmıştır. Böylelikle KLL hastaları biyolojik davranışı birbirinden farklı iki alt gruba ayrılmıştır. Çeşitli çalışmalardan edinilen bilgiye göre; IgVH geni germline sekansında %2'den fazla deviasyonlu vakalar mutasyonludur (15,17,129). Mutasyonsuz gen sekansı somatik olarak mutasyonlu gen sekansı ile karşılaştırıldığında daha agresif hastalık ve daha kısa yaşam süresi ile ilişkilidir (15,17). U-KLL ve M-KLL olguları, klinik seyir, tedavi gereksinimi, sitogenetik anormallikler ve sağkalım açısından farklılık göstermektedir (35). Erken evredeki hastalarda, klinik evreden ve sitogenetik anormalliklerden bağımsız olması, IgVH mutasyon durumunun prognostik önemini göstermektedir (130).

IgVH mutasyon testi pahalı, teknik olarak zor ve klinik kullanım için uygun değildir. Ig gen sekansı belirlenmesi oldukça pahalı ve zor bir teknik işlemdir. Teknik uygulamanın zorluğundan ötürü, IgVH mutasyon durumunu yansıtacak biyolojik belirteçler üzerinde durulmaktadır. IgVH mutasyon durumu ile ilişkisi gösterilmiş faktörler ZAP70, CD38, TK, sitidin deaminaz, lipoprotein lipaz A ve ADAM 29'dur (9,99). Özellikle CD38 ve ZAP70 ile ilişkisi incelenmiş, ancak varolan ilişkinin mutlak bir ilişki olmadığı, bu parametrelerin her birinin bağımsız prognostik faktör olduğu konusunda ortak görüş oluşmuştur (101). IgVH mutasyon analizi, karmaşık, pahalı ve çalışma süresi uzundur (10,15). Bu nedenle rutin tanısal laboratuvar testi olarak kullanılması uygun değildir (131).

b)CD38 ekspresyonu

CD38, hematopoietik hücrelerin yüzeyinde bulunan bir glikoproteindir (2,132). IgVH mutasyonunu test etmenin teknik zorlukları ve maliyetle ilişkili olarak mutasyonel durumun yerini tutan bir markerın araştırılması, KLL'de neoplastik hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen CD38'in keşfine yol açmıştır (59). CD38, KLL'de bağımsız prognostik faktörlerden biridir (8,99). IgVH mutasyon durumu ile değişen oranlarda ilişkisi gösterilmiştir. U-KLL olgularında ekspresyonu artarken, M-KLL olgularında azalmıştır. CD38 ekspresyonu zamanla değişebilmektedir, bu nedenle IgVH gen mutasyon durumu ile arasında mutlak bir ilişkiden bahsedilmesi mümkün

değildir. Farklı eşik değerlerinin esas alınması standardizasyonunu ve klinik kullanımını güçleştirmektedir (2,9,34,35,44,99).

CD38'in yüksek oranda ekspresyonu, ileri evre hastalık ve kemoterapiye kötü yanıtla ilişkilidir (18). CD38 ekspresyonu 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 (1,18,40,133). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada CD38 pozitif olan KLL hastalarında, negatif olanlara göre tedavisiz izlem süresinin daha kısa olduğu gösterilmiştir (133).

Günümüzdeki farklı çalışmalarda CD38 ekspresyonunda eşik değeri konusu tartışmalıdır (1). Bazı çalışmalarda eşik değer olarak % 30'un kullanılması önerilmiştir (134). Sonraki çalışmalarda % 7 (129), % 5 (105) gibi eşik değerlerin de prognozda önemli olduğu bildirilmiştir. CD38'in bağımsız bir prognostik faktör olduğu düşünülmektedir (134).

c) ZAP70 ekspresyonu

Zeta zincir ilişkili protein kinaz 70 esas olarak T ve NK hücrelerinde bulunan ve T hücre aktivasyonunda fonksiyon gören bir tirozin kinazdır (2,34,105,135). IgVH mutasyonlu ve mutasyonsuz vakalar arasında ayırım yapmak için ZAP70'in değeri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (20,136). ZAP70 pregerminal U-KLL olgularında pozitif, postgerminal M-KLL olgularında negatiftir (9,34,44). Bir çalışmada ZAP70'in IgVH mutasyon durumunu ayırabilen en iyi gen olduğu öne sürülmüştür ve hastaların %93'ünde mutasyon durumu tam olarak belirlenmiştir (136). ZAP70'in tedavi etme süresini belirlemedeki rolü IgVH mutasyon durumu ile benzer olarak bulunmuştur. Böylece, ZAP70 KLL'de IgVH mutasyon durumunu göstermede önemli bir belirteç haline gelmiştir (59).

Diğer prognostik faktörlerle karşılaştırıldığında zaman içinde sabit kalan ifadenleme oranı, ZAP70'in IgVH mutasyon durumunu yansıtmaya duyarlılığını arttırmıştır (9,35,44). İlerleyici hastalık durumunda ZAP70 ekspresyonunun değişebileceğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (63). Kemik iliği hücrelerinde ZAP70 ekspresyon oranı daha yüksektir ve T hücre uyarılmasına neden olan durumlarda düzeyi artabilir (105).

İmmünohistokimya ZAP70 ekspresyonunu ve KLL'deki prognostik önemini değerlendirmede güvenilir bir araçtır ve flow sitometriye alternatif bir metod olarak kullanılabilir. Aynı zamanda rutin olarak fikse edilmiş ve parafine gömülmüş doku kesitlerinde immünohistokimya ile ZAP70'in mutasyonlu IgVH genlerinin spesifik (%92) ve göreceli olarak sensitif (%78) bir markerı olduğunu tanımlamıştır (137).

Zeta zincir ilişkili protein kinaz 70 KLL’de bağımsız prognostik faktör olarak kabul edilmektedir (2,8,9,35,44,63,105). ZAP70’in ilk tedaviye kadar geçen süreyi etkileyen en önemli faktör olduğu vurgulanırken, IgVH mutasyon durumu ve CD38’in olgularda risk değerlendirmesinde kullanılması önerilmektedir (35). ZAP70 ekspresyonunun ilerleyici hastalık ve sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (20). Ancak teknik standardizasyon eksikliği ve eşik değer farklılıkları klinik uygulamada çözülmesi gereken sorunlardır (2,11,105). ZAP70 KLL hastaları için önemli bir prognostik faktördür. Ayrıca, KLL’nin patogenezinde ZAP70’in rolü hususunda daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır (59).

d) Kromozomal anormalliklerin varlığı

Kronik lenfositik lösemi’de kromozomal anormallikleri KLL’nin düşük proliferasyon oranı sebebiyle primer olarak geleneksel sitogenetik analizle saptamak zordur. Çoğu KLL hücresi apoptozisdeki defekte bağlı olarak uzayan yaşam süresi nedeniyle G0 fazı hücreleridir. (59,138) KLL hastalarında kromozomal anormalliklerin tanınmasıyla farklı prognoza sahip altgruplar belirlenmiştir (139). Konvansiyonel sitogenetik analiz kullanarak KLL’li hastaların %50’sinden fazlasında kromozom anormallikleri saptanabilmektedir. İlk çalışmaların tanımladığı kötü prognoz faktörleri trizomi 12, 11q- ve 17p-’dir (140). Konvansiyonel G bandı kromozomal analizi ile KLL’de saptanan en yaygın kromozomal anormallik trizomi 12 olarak adlandırılan ekstra kromozom 12’dir. Bunu tek başına ya da kromozom 13q14’ün translokasyonu veya delesyonları ile birlikte görülen kromozom 11, 13 ve 14’ün yapısal anormallikleri izler (141). Konvansiyonel sitogenetik çalışmalar ile KLL hastalarının % 30-40’ında sitogenetik anormallikler gösterilirken, FİSH’de çoklu prob kullanılarak bu oran % 80’e ulaşmaktadır (142). FİSH tekniklerinin gelişmesi ile bölünmeyen hücrelerde seçilmiş kromozomal anormalliklerin saptanması kolay hale gelmiştir (59). FİSH ile metafaz ve interfaz hücrelerinin her ikisinde de özgün kromozomal anormallikler saptanabilir (142). KLL’de FİSH problemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda kromozomal anormallikler konvansiyonel sitogenetik ile saptanandan daha yaygın ve farklı dağılımda bulunmuştur. FİSH ile KLL’de saptanan en yaygın kromozomal anormallikler kromozom band 13q14’ü içeren delesyondur, bunu 11q22.3-q23.1 delesyonu ve trizomi 12 takip eder (139,141).

Kronik lenfositik lösemi’ye özgü bir anomali yoktur. KLL hücreleri hastalığa spesifik olmayan birkaç genetik anormallik taşıyabilir (1). KLL’de multipl kromozomal anormalliklerin varlığı kötü prognozun göstergesi olarak kabul edilmektedir (143). En sık görülen genetik anormallikler 13q14 delesyonu (>%60), 11q22.23 delesyonu (%20), trizomi 12 (%20), 6q21 delesyonu (%3-6) ve 17p13 delesyonudur (<%10) (68) (Tablo 8). KLL olgularının %20-40’ında,

gelişmiş sitogenetik teknolojiler kullanılmasına rağmen genetik bozukluk gösterilemez. Sitogenetik bozukluğun olmaması iyi prognoz göstergesidir (139).

Tablo 8: Kronik lenfositik lösemide görülen kromozomal anormallikler

Kromozomal anormallik	Görülme sıklığı	Prognoz
13q14 delesyonu	>%60	İyi
11q22.23 delesyonu	%20	Kötü
Trizomi 12	%20	Kötü
6q21 delesyonu	%3-6	Tartışmalı
17p13 delesyonu	<%10	Kötü
14q32 translokasyonu	%4-9	Kötü

Kromozom 13 anormallikleri

Kronik lenfositik lösemi’de kromozom 13 anormallikleri 13q14 bandında interstisyel delesyon ya da kromozomun daha geniş bir bölgesinde delesyon ile karakterizedir. 13q14 delesyonlarının çoğu sitogenetik seviyede saptanamaz fakat 13q14 bölgesi için spesifik moleküler problemlerin kullanılması ile KLL’li olguların % 50’sinden fazlasında saptanabilir (59). 13q14 delesyonlarında erken klonal sapmalar mevcuttur. Bu durum KLL’nin gelişiminde esansiyel olabilen bir tümör süpresör gende kayıp ya da inaktivasyonun varlığını düşündürür. 13q14 bölgesi iyi karakterize edilmiş retinoblastom genini barındırır. Retinoblastom geninde monoalelik kayıp KLL hastalarının yaklaşık %30’unda görülür (144). Bütün alellerde bozulma nadirdir (59). Sonraki çalışmalarda KLL’de daha büyük sıklıkla saptanan 13q14 bandının distaline lokalize D13S25 ve D13S319 ilave loküsleri tanımlanmıştır. Bu bölgelerin lokalize yeni tümör süpresör genler açısından rolü olduğu varsayılmaktadır (145).

Son zamanlarda 13q14 bölgesinde lokalize micro-RNA’ların delesyonu KLL’nin patogeneze dahil edilmiştir. İki micro-RNA geninin alelik kaybı, miR15 ve miR16 KLL vakalarının %65’inden fazlasında 13q14 bölgesinde lokalizedir ve 13q14 delesyonlu KLL vakalarında miR15 ve miR16 ekspresyonlarının down-regülasyonu ile koreledir (146). İlave olarak bu genler sadece KLL hastalarında bulunan germline mutasyonların yerleşim yeri olarak bilinir. Böylece bu genlerin KLL’nin patogenezinde fonksiyonel bir rolü olduğu ifade edilir. Ayrıca prognostik altgrupları açıkça tanımlayan ve IgVH mutasyon durumu, ZAP70 ekspresyonu ve

hastalık progresyonu ile korele olan farklı bir micro-RNA ekspresyon profilleri tanımlanmıştır (147).

Kronik lenfositik lösemi’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 interstisyel bölgenin kaybı buna eşlik eder. Olguların yaklaşık olarak üçte birinde her iki alel delesyonu birden görülür (148). Sadece 13q delesyonu varsa prognoz iyidir (13,129). Takipte başka kromozomal anormallikler oluşursa 13q14 delesyonunun olumlu etkisi ortadan kalkar (148).

Kromozom 11 anormallikleri

Kromozom 11’deki yapısal sapmalar, lenfoproliferatif hastalıklarda en sık olarak tekrarlayan genetik olaydır (141,149). KLL’de en sık kaybolan bölge kromozom 11’in uzun kolunun q22 ve q23 bandları arasında yer alır. Bu delesyon, tüm KLL hastalarının %12-21’inde rapor edilmiştir (139). 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 bir etkisi bulunmaktadır ve yetmezliği durumunda KLL dışı lenfoproliferatif hastalıkları da içeren bazı malignitelerin sıklığının arttığı görülmüştür (148). 11q delesyonu daha çok genç olgularda görülür. Bu delesyonun büyük lenf nodları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. 11q22.23 delesyonu bulunan hastalar, erken başlangıçlı ilerlemiş hastalık, yaygın iri lenfadenopati, hızlı LKZ ve daha kısa süre tedavisiz dönem sebebiyle sıklıkla kötü prognozludur. 11q22.23 delesyonu taşıyan tümör hücreleri sıklıkla kontrol hücre siklus progresyonu ve sinyal yollarındaki genlerde up-regülasyon gösterir (149,150). KLL vakalarının 2/3’ünden fazlasında ATM’de monoalelik kayıp vardır. Diğer kaybolmamış alel de sıklıkla mutasyon noktaları taşır ve genellikle PI-3 kinaz bölgesindedir (151). Son zamanlarda, hastalıkla ilişkili genler için yapılan bir çalışmada 11q22-23 bölgesinde 3 yeni aday gen tanımlanmıştır. Bunlar NPAT (hücre siklus regülasyonu), CUL5(ubiquitin-bağımlı apoptozis regülasyonu) ve PPP2R1B (PP2A’yı regüle eden hücre siklusu ve apoptozis komponenti)’dir. Bunların 11q delesyonlu KLL vakalarında down-regülasyon gösterdiği gözlenmiştir (152).

Trizomi 12

Trizomi 12 band tekniği kullanılarak yapılan konvansiyonel sitogenetik analiz ile değerlendirildiğinde KLL’de saptanan en yaygın genetik anormalliktir. FISH ile değerlendirildiğinde, insidans hafifçe daha yüksek saptanır (59,153). Trizomi 12’nin oluşması, çetikli sitomorfoloji, lenfoplazmasitoid diferansiyasyon, güçlü CD20 ekspresyonu, FMC7 pozitifliği ve yüksek frekanslı CD38 ekspresyonunu içeren atipik morfolojik ve immünofenotipik

özellikler gösteren KLL’de daha yaygındır (153). İlave olarak trizomi 12 ile giden KLL vakalarında sıklıkla kötü prognoz habercisi olan mutasyonsuz IgVH vardır. Çok sayıda çalışmada KLL’de trizomi 12’nin prognostik etkisi değerlendirilmiş ve bu anormalliğin kazanılmasının ileri evre hastalık, progresyonda daha kısa zaman ve önemli ölçüde kötü ortalama sağkalım oranları ile ilişkili olduğu bulunmuştur (154). Ancak Trizomi 12 içeren ve içermeyen KLL vakalarındaki aday genlerin protein ekspresyon analizleri arasında önemli bir farklılık saptanmamıştır, bu da posttranslasyonel mekanizmalarda ekspresyon kontrolünün ortadan kalktığını düşündürmüştür (155).

6q Delesyonu

6. kromozomun uzun kolundaki delesyonlar konvensiyonel sitogenetik analiz ile KLL vakalarının %3-6’sında saptanmışken, FISH analizi ile vakaların %9’undan fazlasında 6q21 delesyonları gösterilmiştir (156). 6q delesyonları KLL’nin nodal karşılığı olan SLL’de daha yaygındır (157). Aynı zamanda yüksek lenfosit sayısı, yayılmış lenfadenopati ve splenomegali ile giden artmış prolenfosit sayısı ile ilişkilidir (59,157). Morfolojik olarak, 6q delesyonu içeren vakalar büyük lenfositler, immünoblast benzeri hücreler, prolenfositoid hücreler ve çentikli lenfositleri içeren atipik özellikler gösterir (158). Yapılan bir çalışmada KLL’li 217 vaka analiz edilmiş ve 6q delesyonu olan KLL vakalarının yüksek insidanslı atipik morfoloji, CD38 pozitifliği ile giden klasik immünofenotip ve mutasyonlu IgVH geninin orta derecede insidansı ile karakterize olduğu bulunmuştur (59,158).

17. kromozomun p13 bandında anormallikler

Kronik lenfositik lösemi’de kromozom 17’den genetik materyalin kaybı sıklıkla kısa kolda görülür ve daha spesifik olarak 17p13 bandındadır (59). 17p delesyonu, KLL olgularında yaklaşık %10 oranında görülür (74). 17p13 bölgesinde bulunan p53 tümör baskılayıcı gen programlı hücre ölümünün düzenlenmesinde anahtar moleküldür (148). KLL’de fonksiyonel p53 yolu pürin nükleozid analoglarına yanıt vermede önemli bir göstergedir. Bu da 17p delesyonu anormalliklerinin prognostik önemini açıklar (159).

Kronik lenfositik lösemi’de, 17p13 kromozom bölgesinin delesyonunda prognoz kötüdür. Hastalık ilerlemesinin 1-2 yıl içerisinde olacağını gösterir ve göreceli olarak kemoterapi direnci söz konusudur (129). Aynı zamanda 17p delesyonu kısa tedavisiz izlem süresiyle de ilişkilidir (142).

Kromozom 14'deki anormallikler

Kronik lenfositik lösemi'de kromozom 14'deki anormallikler nadir olmasına rağmen, vakaların yaklaşık % 4-9'unda görülür ve genellikle IgVH genini barındıran 14q32 bandını içerir (160). Bu bölgede delesyonlar ya da kayıplardan ziyade translokasyonlar sıklıkla rapor edilmiştir. Bu translokasyonların %50'sinden fazlasının 11. kromozomun q13 bandında CCND1 genini içerdiği rapor edilmiştir. Bu t(11;14)(q13;q32) 'ye neden olur ve şimdilerde Mantle hücreli lenfoma'nın esansiyel işareti olarak dikkate alınmaktadır (161). Geriye dönük olarak bu translokasyonları içeren vakalar 2008 yılı WHO klasifikasyonuna göre Mantle hücreli lenfoma olarak kategorize edilmektedir (162). Literatürde vaka raporları sınırlı olmasına rağmen; IgH lokusu diğer kişilerde de translokasyonlar içerebilir. 19. kromozomun q13 bandında bulunan bcl3 genini içeren, bir translokasyon t(14;19)(q32;q13) meydana getirir. Bu translokasyon 19q13 kromozomundaki bcl3 geniyle, 14q32 lokusundaki IgVH zincir genini birleştirir. Ancak bu anormalliğin sağkalım üzerine etkisini değerlendiren prognostik çalışmalar yoktur (59).

İleri araştırmaya gereksinim duyulan prognostik faktörler

Kronik lenfositik lösemi'de bazı sitokin, enzim ve moleküler belirteçlerin de prognostik faktör olabileceği düşünülmektedir (10). Bunlar arasında IL-6 (164), IL-10 (164), TNF-alfa (165), intrasellüler bcl- 2 (166) ve ICAM1 (96) bulunmaktadır. Laktat dehidrogenaz (LDH), hücre döngüsünü gösteren bir belirteçtir. Yüksek LDH düzeyleri sağkalımı olumsuz yönde etkilemektedir (12). Tümör saldırganlığının ya da yüksek tümör yükünün tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır (167). LDH yüksekliğinin hücre çoğalmasını yansıttığı düşünülmektedir (D168). 190 KLL'li hastada yapılan bir çalışmada LDH ile toplam sağkalım ve tedavisiz izlem süresi arasında önemli ilişki saptanmıştır (133).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, anjiogenin ve anjiopoetin-2 KLL patogenezi ve prognozunda etkisi araştırılan diğer faktörlerdir. İleri evre ve ilerleyici hastalık ile ilişkili oldukları gösterilmiştir (8). KLL'de hücre bölünmesi telomeraz aktivitesini arttırmakta ve telomer uzunluğunu kısaltmaktadır. Yüksek telomeraz aktivitesi ve telomer kısalığı olumsuz prognostik faktörlerdir (2, 12).

2.4.10. Malign transformasyon ve klinik progresyon

Kroftun tarifine göre; transformasyon, (169) zemindeki düşük dereceli yavaş gelişimli lenfomadan morfolojik olarak farklı görünen agresif bir lenfomanın gelişimi olarak tanımlanabilir. Genel olarak KLL yavaş seyirli bir hastalık olarak bilinir. Hastaların çoğu tanı sonrası uzun yaşar ve lösemi ile ilişkisiz sekonder sebepler nedeniyle ölür (59). Transformasyon vakaların yaklaşık %5-10'unda meydana gelir ve hastalık progresyonu, tedaviye direnç ve özellikle kötü prognoz ile ilişkilidir (170). Bu transformasyona sıklıkla ya daha önce varolmayan ya da yaygın olarak trizomi 12'ye ilave olan kompleks kromozomal değişiklikler eşlik eder (59, 171).

Kronik lenfositik lösemi'de transformasyonun çeşitli tipleri tanımlanmıştır. İmmatür görünümü, daha ince nükleer kromatin paternli ve belirgin nükleoluslu, daha büyük lenfoid hücrelerden oluşan yeni bir popülasyonun proliferasyonu varsa göreceli olarak düşük gradeli ve yavaş progresif olan 'prolenfositik transformasyon' terimi önerilir. Bu tüm KLL vakalarının yaklaşık %2'sinde görülür. Periferik kanda % 11-55 aralığında prolenfosit popülasyonunun artması ile karakterizedir ve ortalama sağkalım 2 yıldır. Bu gibi transformasyona B semptomları, periferik kan sayısında hızlı artış, splenomegali ve artmış LDH düzeyi eşlik eder (59).

Yüksek dereceli bir Non-Hodgkin lenfoma'nın gelişimi ile karakterize KLL'de transformasyonun diğer formu, çok büyük sıklıkla Diffüz büyük B-hücreli lenfoma, Richter sendromu ya da Richter transformasyonu olarak adlandırılır (171). Maurice N. Richter bu sendromu orijinal olarak 1928'de KLL'li bir hastada büyük hücreli lenfomanın hızlı bir gelişimi olarak tanımlamıştır (59). Hastalık ortalama 4-5 aylık sağkalım ile oldukça progresiftir. Richter sendromu klinik olarak hızlı başlangıçlı B semptomları, lenf nodlarının progresif genişlemesi, hepatosplenomegali, belirgin ölçüde artmış LDH seviyesi, paraproteinemi, hiperkalsemi ve periferik kanda dolaşımdaki immünoblastların varlığı ile karakterizedir (172). Tutulan dokudan biyopsi ile tanının değerlendirilmesi gerekir (59).

Transformasyonun en yaygın morfolojik tablosu Diffüz büyük B hücreli lenfoma'nın immünoblastik varyantıdır. Bu varyant minimal nükleer membran düzensizliği gösteren, veziküler kromatinli, oval-yuvarlak nükleuslu, tek belirgin nükleoluslu, değişken eozinofilik sitoplazmalı büyük hücrelerden oluşur. Bu hücreler ya nodal yapıyı tamamen bozar ya da zemindeki KLL neoplastik hücreleri ile karışık haldedir. Sentroblastik sitomorfoloji ile giden Diffüz büyük B hücreli lenfoma varyantı daha az sıklıktadır. KLL'nin Diffüz büyük B hücreli lenfoma transformasyonlu çoğu vakası IgD ekspresyonu ve CD5 downregülasyonu dışında KLL'nin çoğu immünofenotipik özelliklerini taşırlar (170). Ancak bazı vakalarda CD5 pozitifliği kalabilir (59, 170, 173). Bu gibi vakaların Richter transformasyonu ya da CD5 pozitif de novo Diffüz büyük B hücreli lenfoma'dan ayrılması zor olabilir. CD5 pozitifliği gösteren KLL'nin Diffüz büyük B

hücreli lenfoma transformasyonunda aynı zamanda CD23 de eksprese edilir. Bu özellik yaygın olarak CD5 pozitif de novo Diffüz büyük B hücreli lenfoma vakalarında görülmez. İlave olarak, bunlarda CD5 pozitif de novo Diffüz büyük B hücreli lenfoma'nın bcl-6 gen yeniden düzenlenimleri genellikle yoktur (173).

Kronik lenfositik lösemi'den Richter sendromu'na transformasyonda altta yatan moleküler mekanizmalar hala tam olarak açıklanamamıştır. Kompleks genetik anormalliklerin kazanılmasının transformasyondan sorumlu olabileceği düşünülmektedir (59). Bu bakımdan Richter sendromu vakaları KLL'de yaygın olarak gözlenen kromozom 11, 12, 13 ve 17 anormalliklerinin varlığı açısından incelenmiştir (171). KLL'de hastalık progresyonu ve yüksek proliferasyon oranları yanında atipik morfoloji ve immünofenotip ile ilişkili 11q23 delesyonları ve trizomi 12 Richter sendromu'nda da yüksek oranda bulunmuştur ve bu yüzden Richter sendromu'nun patogeneze dahil edilmiştir (174). İlave olarak, p53 Richter sendrom'lu hastaların %40'ında ve KLL'li hastaların %15'inde gösterilmiştir (121). Richter sendromu patogenezinde görülen diğer tümör supresör gen anormallikleri p27 ve Retinoblastom'da delesyon, p21 ve p16INK4A mutasyonları, c-myc artmış kopya sayıları, A-MYB geninin azalmış ekspresyonu ve hMLH1 promoterin hipermetilasyonudur (59). Richter sendrom'lu hastalarda aynı zamanda sık karyotipik anormalliklerin KLL'nin Richter sendromu'na transformasyonundan sorumlu olduğunun kanıtı olarak, tek bir kromozom anormalliğinden ziyade genomik instabiliteyi düşündüren mikrosatellit stabilitesinin yüksek seviyeleri ve kromozom 11, 17 ve 20'de heterozigozite kaybı görülür (171).

Kronik lenfositik lösemi hastalarının küçük bir kısmında hastalığın seyri boyunca Richter transformasyonunun Hodgkin varyantı olarak tanımlanan klasik Hodgkin lenfoma gelişir. Transformasyonun bu formu oldukça nadirdir, KLL vakalarının %0,4-0,5'inde raporlanmıştır (175). Morfolojik olarak klasik Hodgkin lenfoma özellikleri gösteren Richter sendromu'nun iki formu tanımlanabilir. Birinci formunda, neoplastik KLL hücrelerinin zemininde seyrek Hodgkin ve Reed-Stenberg hücreleri vardır. Diğer formunda, klasik Hodgkin lenfoma ve KLL bir arada görülür. Eozinofil, plazma hücreleri ve nötrofillerden oluşan tipik polimorföz bir zeminde bulunan Reed-Stenberg hücreleri KLL hücrelerinden ayrılır. Morfolojik benzerliğe ilave olarak büyük hücreler tipik Reed-Stenberg hücrelerinin immünofenotipik özelliklerini gösterirler. (CD15+, CD30+, CD45- ve CD20 -/+) Reed-Stenberg hücreleri ve KLL hücreleri arasındaki klonal benzerlik IgH CDRIII bölgesinin PCR temelli tek hücre analizi ile değerlendirilmiş olup, KLL ve Reed-Stenberg hücrelerinin her ikisinin de özdeş IgH CDRIII sekanslarını paylaştıkları saptanmıştır. Bu da Reed-Stenberg özellikleri ile giden Richter sendromu vakalarının bazılarında, Reed-Stenberg ve KLL hücrelerinin aynı klonun bir parçası olduğunu düşündürmektedir (59).

DNA sekansı ve immünohistokimya çalışmaları bu iki hastalığın paylaştığı klonal orjini gösterirler (175). Richter sendromu Hodgkin varyantı ile giden hastalarda ortalama sağkalım sadece klasik Hodgkin lenfoma hastalarından ya da KLL ve klasik Hodgkin lenfoma bir arada bulunan hastalardan daha azdır. Fakat bu olgular hastalığı klasik Richter sendromu olgularından daha iyi geçirmektedirler (59).

Nadir olgularda, nodüler sklerozan veya mikst sellüler tip Hodgkin lenfoma gelişebilir (30, 39). Hodgkin lenfoma komplikasyonu gelişmiş hastalarda prognoz kötüdür, ancak Diffüz büyük B hücreli lenfoma'ya dönüşmüş olguların prognozundan daha iyidir (39). Richter sendromu ve bunun Hodgkin varyantına ilave olarak, multipl myelom, plazmablastik lenfoma, T hücreli lenfoma, Akut lenfoblastik lösemiye içeren sekonder lenfoid malignansiler KLL transformasyonunun olağandışı varyantları olarak literatürde belgelenmiştir (59, 171).

2.4.11. Ayırıcı tanı

Kronik lenfositik lösemi'nin ayırıcı tanısı geniştir. Bunlar; Akut lenfoblastik lösemi, Prolenfositik lösemi (PLL), Mantle hücreli lenfoma, Folliküler lenfoma, Tüylü hücreli lösemi, Reaktif lenfositosis, Monoklonal ve benign poliklonal B hücreli lenfositosis, Marjinal zon lenfoma, Nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfoma veya lenfositlen zengin tip Hodgkin lenfomadır. (59, 96) (Tablo 9).

Akut lenfoblastik lösemi ve KLL çoğu vakada yalnızca morfolojik özelliklere dayanarak kolaylıkla ayrılabilir. Lenfoblastlarda KLL lenfositlerine göre daha düzgün bir nükleer kromatin paterni vardır. İyi boyanmış bir kan yaymasında incelenen yeterli tek katlı bir alanda ayırım kolaydır. Lenfoblastların daha küçük ve özellikle L1 tip olduğu nadir vakalarda terminal deoksiribonükleotidil transferaz'nin (TdT) gösterilmesi yararlıdır. Lenfoblastlar nükleer TdT ile pozitif sonuçlar gösterirken, KLL vakalarında TdT negatiftir (59).

Prolenfositik Lösemi (PLL) dolaşımdaki prolenfositlerin baskınlığı (%55'ten daha çok, genellikle %70'ten fazla) ile karakterizedir (59). Prolenfositler KLL'de görülen tipik lenfositlerden daha büyük ve daha az matür görünümlü hücrelerdir. Kromatinleri tipik KLL lenfositinden daha az kondansedir fakat lenfoblastınkinden daha az dağınıktır. Geniş belirgin veziküler nükleolus prolenfositlerin karakteristik bir özelliğidir. Prolenfositler aynı zamanda KLL'li hastalarda da görülebilir fakat dolaşımdaki hücrelerin %10'undan daha az olarak sayılır. Prolenfositler % 11-55 arasında olduğunda, KLL'nin mikst hücreli tipi ya da KLL/PLL tanısı verilir (176). Bu kategori prolenfositoid transformasyonlu hastaları içerir. Prolenfositleri %55'in üzerinde olan vakalar PLL olarak tanı alır (59). De novo PLL'li hastalarda genellikle hızlı artan beyaz kan hücre sayıları (sıklıkla 100×10^9 hc/L'den daha büyük) ve lenfadenopati olmaksızın belirgin splenomegali mevcuttur (177). PLL'nin immünofenotipik özellikleri KLL'den ayırır

yardımcıdır. PLL'de neoplastik hücreler Ig, CD19 ve CD20 ile yoğun pozitif, CD5 ve FMC7 ile değişken pozitif ve CD23 ile negatif boyanır. PLL'li çoğu vaka güçlü CD20, Ig ve diğer B hücre markerları olan CD19 ve CD22 ile reaktivite gösterdiğinden B hücre niteliğindedir (178).

Mantle hücreli lenfoma'da sıklıkla tanı anında vakaların %75'inden fazlasında periferik kan tutulumu vardır. Bu koşullar altında Mantle hücreli lenfoma'nın morfolojik olarak tanınması ve bunun KLL'den ayrılması tanısal bir zorluktur. Bu iki antitenin ayrımı önemlidir (39,41,59,179). Çünkü bu iki antitenin klinik gidişi ve tedavileri farklılıklar göstermektedir (39,41,179). Mantle hücreli lenfoma'nın 3-5 yıl olan ortalama sağkalım süresi ile kötü prognozlu olması dikkate değerdir (59). Mantle hücreli lenfoma'da dolaşımdaki lenfoma hücrelerinin sayısı KLL'deki kadar belirgin değildir (180). KLL'de neoplastik lenfositler yuvarlak ve düzgün nükleer membrana sahip iken, Mantle hücreli lenfoma'da hafif veya belirgin nükleer düzensizlik izlenir (39,41,179). Dolaşımdaki lenfoma hücreleri küçük-orta boyutlu neoplastik lenfoid hücrelerin heterojen popülasyonundan oluşur ve genellikle normal lenfositlerden hafifçe daha büyüktür. Hücrelerin nükleer özellikleri ve sitolojisi değişkendir: Yuvarlak-çentikli nükleer kontürler, kümelenmiş-dağınık ve bazen blastoid kromatin görülür. Lenf nodlarında Mantle hücreli lenfoma lenf nodu yapısını tamamen silen diffüz bir patern gösterir (59). Aynı zamanda nodüler ya da mantle zon patern de görülebilir. Psödofoliküller/proliferasyon merkezlerinin yokluğu, zeminde epitelooid histiyositlerin ve hyalinize venüllerin varlığı, çentikli nükleuslu küçük-orta boyutlu neoplastik hücrelerin monoton popülasyonu KLL'den ziyade Mantle hücreli lenfoma'yı destekleyen morfolojik ipuçlarından bazılarıdır (181). Lenf nodu tutulumu olduğunda KLL'de genellikle psödofoliküller vardır. Mantle hücreli lenfoma'da ise psödofoliküller nadiren bulunur ve bu olguların prognozu KLL'ye benzer. Her ikisinde de mitotik aktivite düşüktür (39,41,179). İmmünohistokimyasal çalışmalar bu iki antiteyi ayırmada yardımcıdır. KLL hücreleri CD20, CD5 ve CD23 pozitif, siklinD1 negatiftir. Mantle hücreli lenfoma ise CD20 ve CD5 pozitif, CD23 negatiftir. Ayrıca siklinD1 ekspresyonu izlenir (39,179). Mantle hücreli lenfoma'lı tipik bir vakada parlak Ig ekspresyonu ile CD19, CD20, CD5 ve FMC7 pozitifliği gözlenir. KLL'ye zıt olarak Mantle hücreli lenfoma'daki hücrelerde CD23 yüzey antijen ekspresyonu yoktur (65,178). Siklin D1 mRNA ve proteininin overekspresyonu ile sonuçlanan BCL1/siklin D1 ve IgH genlerini içeren t(11;14) (q13;q32), Mantle hücreli lenfoma'nın esas işareti olarak dikkate alınır (182). Bu kromozomal translokasyon vakaların %70'inde Southern blot analizi ya da vakaların %30-45'inde PCR ile saptanabilir (183). İmmünohistokimyasal boyama ile siklin D1 pozitif bir tümörde esansiyel olarak KLL dışlanır (59).

Foliküler lenfoma, vakaların %5-23'ünde lösemik faza ilerleyebilir (184). Bu vakalarda KLL'de görülen derecede olmasa da değişen oranlarda lenfositosis görülebilir (59).

Foliküler lenfoma'da dolaşımdaki hücreler dar sitoplazmalı, düzensiz yarıklanmalar, tırtıklar ve nükleusun tüm genişliği boyunca devam eden katlantılar gösteren düzensiz biçimli nükleuslu olup, küçüktürler. Nükleer yarıklar KLL vakalarının alt gruplarında özellikle atipik özellikler gösterenlerinde görülebilir. Bu gibi vakalarda, immünofenotipleme ayırımı yardımcı olabilir. Lenf nodu ve ektranodal dokularda, Foliküler lenfoma nodüler ya da diffüz dağılım gösterebilir ve değişen oranlarda sentrositler (küçük yarıklı hücreler) ve sentroblastların (büyük yarıksız hücreler) karışımından oluşur. KLL'nin immünolojik markerları ile karşılaştırıldığında, Foliküler lenfoma güçlü Ig, CD22 pozitifliği, CD5 negatifliği, ve sıklıkla CD10 pozitifliği gösterir (65,178). İlave olarak, Foliküler lenfoma'da %70-95 oranında bulunan t(14;18) (q32;q21) ya da bcl-2 gen yeniden düzenlenimlerini değerlendiren moleküler ve sitogenetik çalışmalar Foliküler lenfoma'yı KLL'den ayırmada yardımcıdır. Bu translokasyon Foliküler lenfoma vakalarının %95'inden fazlasında FISH ile ya da %80'inden fazlasında Southern blot analiz ile saptanabilir (183).

Tüylü hücreli lösemi morfolojik ve immünofenotipik özellikler yanında tanı anında da KLL'den farklıdır (65). Tüylü hücreli lösemi'li çoğu hastada hali hazırda periferik pansitopeniler (özellikle monositopeniler), splenomegali, ateş ve kemik iliğinde diffüz infiltrasyon mevcuttur. Lenfadenopati yaygın değildir. Tüylü hücreli lösemi lenf nodlarını nadiren tutar. Periferik kan ya da kemik iliği aspirasyon yaymalarında, neoplastik hücreler karakteristik olarak oval-fasulye biçimli nükleuslu, bol soluk sitoplazmalı, ince, saç benzeri, düzensiz sitoplazmik projeksiyonludur. Kemik iliği aspiratı elde etmede zorluğa yol açan kemik iliği fibrozisi yaygındır (dry tap). Bununla beraber, kemik iliği biyopsisi ve biyopsi imprintleri tanı için esansiyeldir (59). Kemik iliği biyopsisinde berrak bir sitoplazma ile çevrili, sahanda yumurta görünümü yaratan gevşek bir interstisyel lenfositik infiltrat görülür. Spesifik olmasa da en karakteristik sitokimyasal özellik Tüylü hücreli lösemi'de tümör hücrelerinin Tartarat Rezistan Asit Fosfataz (TRAP) boyası ile güçlü pozitifliğidir. İmmünofenotipik olarak Tüylü hücreli lösemi hücreleri, B hücresi ile ilişkili antijenler (CD19, CD20, CD22, CD79a), CD11c(güçlü), CD25 (güçlü), FMC7 ve CD103 ile reaktivite gösterir (65,178).

Reaktif lenfositosis geçici ya da kalıcı bir süreçtir. Geçici formu kendini sınırlar ve yaygın olarak yetişkinlerde CMV, viral hepatit, infeksiyöz mononükleozis gibi viral enfeksiyonlar, çocuklarda Bordetella pertusis sebebiyle görülür (185). İzoniazid ya da allopurinol gibi bazı ilaçların alınması tetikleyebilir ya da hiposplenik durum, otoimmün hastalıklar ya da travma ile ilişkili olabilir. Reaktif lenfositler sıklıkla değişen miktarlarda hafif bazofilik sitoplazmalı ve hafifçe genişlemiş olarak görülür, bazılarında belirgin nükleolus gözlenebilir. Sitoplazmik vakuolizasyon mevcut olabilir. Baskın hücre tipi CD4+, CD8- fenotipte T helper hücreleridir ve bunlar poliklonaldır (59).

Reaktif poliklonal B hücreli lenfositosis göreceli olarak nadirdir. Raporlanmış vakaların çoğu kadınlarda meydana gelmiştir ve sigara ile güçlü ilişki gösterir (186). Lenfositosisin derecesi KLL'ye zıt olarak hafiftir. Lenfadenopati ve splenomegali nadirdir. İmmünofenotipik olarak lenfositler CD19 pozitif, CD5 ve CD23 negatif, Ig hafif zincirlerin polipolik ekspresyonu ile CD10 negatiftir (59).

Monoklonal B hücreli lenfositosis hiçbir hematolojik hastalık kanıtı bulunmayan sağlıklı bireylerde, KLL'dekine benzer özellikte B lenfositlerin dolaşımında oldukça düşük seviyelerde (flow sitometrik ya da moleküler) saptanması olarak tanımlanır (187). Bu antite daha önce değişik terimlerle tanımlanmıştır: Benign monoklonal B hücreli lenfositosis, İdyopatik persistan kronik lenfositosis, Önemi saptanamayan B monoklonal lenfositosis, smoldering KLL ve Subklinik KLL (64,187). Çevre kanında $<5 \times 10^9/L$ oranında lenfosit bulunması, ancak eşlik eden lenfadenopati, organomegali veya kemik iliği tutulumuna bağlı sitopeni varlığında klinik tanı KLL'dir. Eşlik eden klinik bulguların olmaması durumunda, tanı monoklonal B hücreli lenfositosisdir. Monoklonal B hücreli lenfositosis, KLL'ye dönüşebilir, gerileyebilir ya da kararlı kalabilir. Görülme sıklığı %0,6'dır. Yaşla birlikte sıklığının arttığı gösterilmiştir. KLL'li hastaların birinci derece akrabalarında görülen monoklonal B hücreli lenfositosis, erken hastalığın göstergesi olabilir (49). Son zamanlarda önerilen tanı kriterleri; monoklonal B hücre popülasyonu kapa/lamba oranı 3/1'in üzerinde ya da 0,3/1'in altında olması, B hücrelerin % 25'inden fazlasında Ig ekspresyonunun az olması ya da olmaması ve KLL'nin diğer klinik ve laboratuvar özelliklerinin yokluğunda hücrelerin KLL immünofenotipinde olmasıdır (187).

Marjinal zon lenfomayı da ayırıcı tanıda akılda tutmak gereklidir. Marjinal zon lenfomada neoplastik hücreler küçük, bükümlü nükleer konturlara sahip ve geniş, şeffaf sitoplazmalı hücrelerdir. Bu hücreler immünohistokimyasal olarak CD5 ve CD23 negatiftirler (39). Her ikisinde de küçük matür görünümlü lenfositlerin diffüz proliferasyonu izlendiğinden, diffüz interstisyel hiperplaziyi KLL'den ayırmak gereklidir. Reaktif folliküllerin, açık sinüslerin ve genişlemiş interfolliküler alanların bulunması, perikapsüler infiltrasyonun ise bulunmaması reaktif lenf noduna ait değişikliklerdir. Hemen hemen tüm KLL olgularında izlenen psödofolliküler proliferasyon merkezleri reaktif lenf nodunda gözlenmez. Ayrıca, reaktif süreçte küçük lenfositler T hücre fenotipi sergilerken, KLL de B hücre kökenlidir (39,41).

Kronik lenfositik lösemi ile nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfoma veya lenfosit zengin tip Hodgkin lenfoma arasında ayırıcı tanı yapmak gerekebilir. Bu iki Hodgkin lenfoma türünde tanısız Reed-Sternberg hücreleri nadirdir veya bulunmayabilir. Bunun yanında bazı KLL olguları Reed-Sternberg hücrelerinden ayıramayan hücreler içerebilir. Büyük nodüllerin varlığı ve germinal merkezlerin progresif transformasyonu nodüler lenfosit predominant Hodgkin

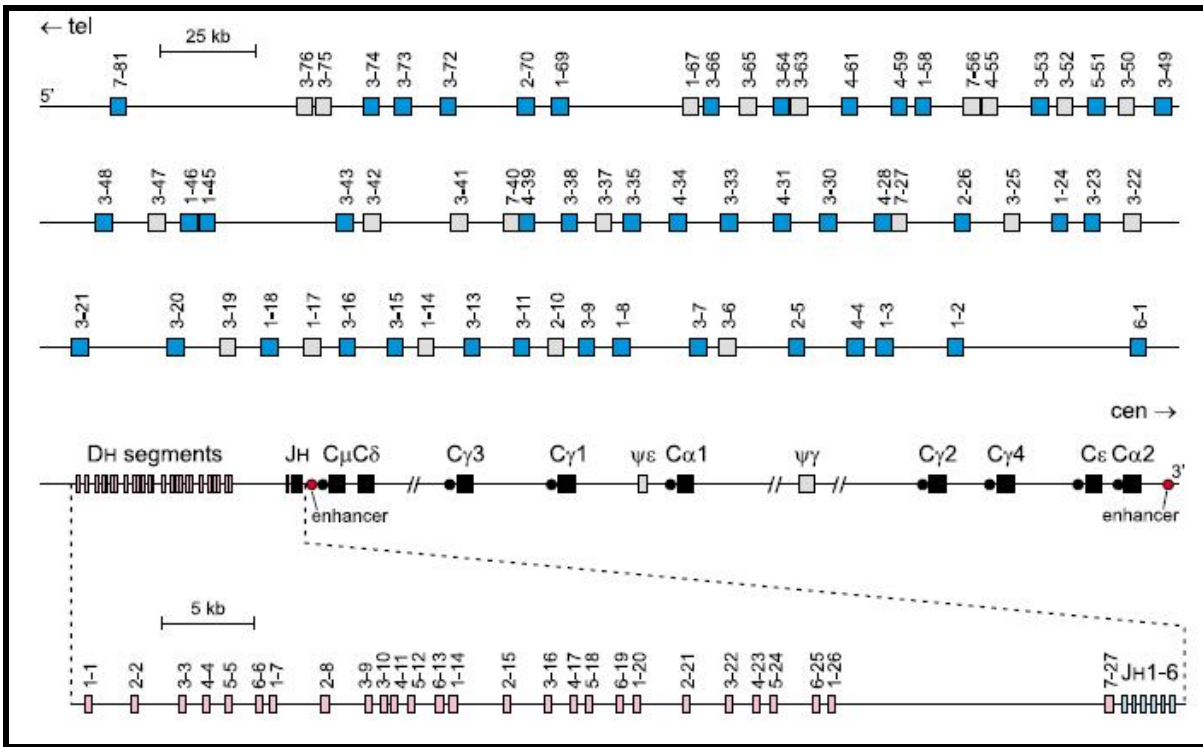
lenfomayı psödofollikülleri bulunan KLL'den ayırmada yardımcı olabilir. Nadir olgularda KLL ile lenfositten zengin Hodgkin lenfoma arasında morfolojik ayırıcı tanı yapmak imkansızdır. Bu durumda immünolojik belirleyiciler yardımcı olur (39).

Tablo 9: Kronik lenfositik lösemi'de ayırıcı tanı (59)

Hastalık	Özellikler	Yaygın immünofenotip	Genetik
KLL	PY: Persistan lenfositosis, 'soccer ball' kromatin paternli küçük hücreler, kıt agranüler sitoplazma, smudge hücreler LN: Proliferasyon merkezleri, PL, paraimmünoblastlar	CD19+, CD20+, CD5+, CD22-, CD23+, CD10-, CD11c-/+, CD43+, klonal sIgM, zayıf sIgD	Del 13q14 Del 11q23 Trizomi 12 Del 6q
PLL	PY: Artmış beyaz kan hücre sayısı, Daha az matür kromatinli, tek belirgin nükleoluslu daha büyük hücreler	CD19+, CD20+, CD5- , CD22+, CD23-, CD10-, parlak klonal sIg	Hastalıkla uyumlu anormallik saptanmamış
Mantle hücreli lenfoma	PY: Homojenöz kondanse kromatinli nükleer kleflli orta büyüklükte hücreler LN: Monoton hücre popülasyonu, Proliferasyon merkezlerinin yokluğu, epiteloid histiyositler ve hyalinize venüllerin varlığı	CD19+, CD20+, CD5+, CD22+, CD23-, CD10- , CD43+, ortalama klonal sIg (IgM>IgD)	t(11;14) (q13;q32)
Foliküler lenfoma	PY: Nükleus genişliği boyunca izlenen katlantılar, düzensiz klefller, sentrositler ve sentroblastlar	CD19+, CD20+, CD5-, CD22+, CD23-, CD10+, CD11c-, CD43-, parlak klonal sIg	T(14;18) (q32;q21)
Marjinal zon lenfoma	PY: Ekzantrik lokalizasyonlu nükleusu ve bol soluk sitoplazmalı plasmasitoid hücreler LN: Regrese germinal merkezler, foliküler kolonizasyon, bol soluk sitoplazmalı düzensiz nükleer kontürlü monositoid hücreler	CD19+, CD20+, CD5- , CD22+, CD23-, CD10-, CD11c-, CD25-, CD103- , ortalama klonal sIg	Trizomi 3
Tüylü hücreli lösemi	PY: Oval ya da fasülye biçimli nükleuslar, bol soluk sitoplazma, ince saçbenzeri düzensiz sitoplazmik projeksiyonlar Kİ: Sahanda yumurta görünümü, TRAP+	CD19+, CD20+, CD5-, CD22+, CD23-, CD10- CD11c+, CD25+, CD103+, ortalama klonal sIg	Hastalıkla uyumlu anormallik saptanmamış
PY: Periferik Yayma; LN: Lenf Nodu; Kİ: Kemik İliği; sIg: Sitoplazmik Ig -/+ : Değişken, daha çok negatif lehine			

2.5. IgVH Mutasyonu

İmmünglobulin geninin (IGH) fonksiyonel düzenlenimi matür B lenfositlerinde önemli bir unsurdur ve takibinde antikor sentezi gerçekleşir. IGH geni kromozom 14q32.3’de lokalizedir ve yaklaşık 1250 kb’lık bir alanı kaplar. Toplam 46-52 fonksiyonel VH segmenti tanımlanmıştır. Bu VH segmentleri kendi homologilerine bağlı olarak 6 ya da 7 subgruba ayrılır. İlave olarak yaklaşık 30 adet non-fonksiyonel VH segmenti tanımlanmıştır. Ayrıca 27 adet fonksiyonel DH segmenti ve 6 adet fonksiyonel JH segmenti bulunmuştur (188,189) (Şekil 3).



Şekil 3 : Kromozom 14q32.3’de lokalize IGH gen kompleksinin şematik diagramı (189)

Normal ve malign B hücrelerinde en sık kullanılan VH gen segmentleri VH3 ailesi (%30-50), VH4 ailesi (%20-30) ve VH1 ailesi (%10-20)’dir. Hepsi birlikte VH gen kullanımının %75-95’ini oluşturur. Ancak Perkürsör B hücreli ALL’de VH6 gen segmentleri göreceli olarak sık kullanılır (189).

VH segmentleri 3 adet çerçeve (framework-FR) ve 2 adet tamamlayıcı-tanımlayıcı bölge (complementarity determining regions- CDRs) içerir. FR’ler çeşitli VH segmentleri arasında benzerlik gösterirken, CDRs aynı VH ailesi içinde bile oldukça farklılık gösterir. Ayrıca, CDRs germinal merkez reaksiyonunun seyri boyunca somatik hipermutasyonların tercih edilen hedefidir. FR’ler genellikle somatik mutasyondan daha az etkilenmesine rağmen, özellikle ağır mutasyonel süreç altındaki B hücrelerde nükleotid değişimleri bu bölgede meydana gelebilir (188).

Malign bir B hücre hastalığının varlığını gösteren klonal B hücre popülasyonlarını saptamak için, yüksek derecede değişken V-D-JH bölgeleri PCR ile amplifiye edilebilir. Klonal B hücreleri poliklonal B hücrelerinden ayrılabilir. Histolojik kesitler ya da hücre süspansiyonlarından klonal B hücre popülasyonunun saptanmasına dayanan PCR temelli stratejiler 1990'ların başında yapılmaya başlanmıştır. Ancak başlangıçta PCR protokollerinde tek VH konsensus primerleri kullanılmış, bu da tüm geni amplifiye etmek için yeterli olmamıştır. Ancak yapılan çalışmalarda aileye spesifik primerlerin yapılması ile IGH mutasyonunun saptanma oranı daha da artmıştır. Ancak bu aileye spesifik primerler büyük ölçüde önceki konsensus primelerinin sekansına dayanır (189).

B lenfositler, gelişimleri sırasında çok çeşitli antijenleri tanıyabilme ve onlara karşı antikor yapabilme kapasitesine sahiptirler. Hücrelerin erken gelişim döneminde Ig ağır (VH) zincirinin V ve D gen bölümleri, J bölümüyle kendine özgü rekombinasyon yapar ve lenfositler yeni bir VDJ genetik yapısı yaratır. VDJ seçildikten sonra, antijene maruz kalan lenfositler germinal merkezde somatik mutasyona uğrarlar. Somatik mutasyonlar, VH zincirinin değişken bölgesinde, gen segmentlerinde Ig molekülü için gerekli kodları sağlamak amacıyla gerçekleşmektedir. Bu işlem ile IgVH gen bölgesine rastgele seçimli nükleotidler yerleşerek, antijene tam uyumlu antikorlar sentezlenir (190).

Son çalışmalar göstermiştir ki, KLL klonlarının yaklaşık % 50'si Ig zincirlerinde somatik mutasyon içermektedir. Bu da bazı KLL klonlarının hafıza B hücreleri denilen post-GC hücrelerden geliştiğini düşündürmektedir (81). KLL hastalarının yaklaşık %50'sinde Ig ağır zincirlerinin değişken bölgelerinde somatik hipermutasyon saptanmıştır. Böylelikle KLL hastaları biyolojik davranışı birbirinden farklı iki alt gruba ayrılmıştır. IgVH mutasyonu olmayan birinci gruptaki hastalarda lösemik hücreler pregerminal merkez kaynaklı olup, ikinci gruptakiler ise somatik mutasyona uğramış germinal merkez veya germinal merkez sonrası hücrelerdir (14,15,16,17).

İki çalışmada simultane olarak IgVH gen mutasyon durumunun prognostik önemi rapor edilmiş ve farklı sağkalım oranları gözlemlenmiştir (15,17). U-IgVH genli hastalar için ortalama sağkalım 8-9 yıl iken, somatik olarak M-IgVH genli hastalarda bu oran 24 yıldan fazla bulunmuştur (17). U-IgVH genli hastalarda somatik olarak M-IgVH genli hastalardan daha agresif bir hastalık, ileri klinik evre, kötü sitogenetik anormallikler ve daha kısa sağkalım gözlenmiştir (15). İlave olarak, U-IgVH genli hastalarda kök hücre transplantasyonu sonrası daha yüksek relaps riski saptanmıştır (191). Diğer bir çalışmada IgVH gen mutasyon durumu ne olursa olsun, kötü yönde çalışan hasta altgruplarını tanımlamak için spesifik IgVH gen sekansları (VH3-21) kullanılmıştır (192). Bu bulgu VH3-21 sekansının seçilmesinin spesifik antijenlere cevap vermede

M-IgVH genli hastalar arasında farklı klinik davranış ortaya çıktığını gösterir (59). Klonların mutasyonlu tipini optimal olarak tanımlayan IgVH genin CDR3 bölgesinde nükleotid mutasyonunun yüzdesi tam olarak standardize edilmemiştir. Çünkü IgVH gen mutasyon testi pahalı, teknik olarak zor ve klinik kullanım için uygun değildir. Ancak çeşitli çalışmalardan edinilen bilgiye göre, IgVH geni germline sekansında % 2'den fazla deviasyonlu vakalar mutasyonludur (15,17,129). IgVH gen mutasyon analizinde eşik değer olarak % 98 esas alınmıştır. Bu şekilde genetik polimorfizmler dışlanmaktadır (15,35,99). Mutasyonsuz gen sekansı somatik olarak mutasyonlu gen sekansı ile karşılaştırıldığında daha agresif hastalık ve daha kısa yaşam süresi ile ilişkilidir (15,17).

Kronik lenfositik lösemi hücrelerinde IgVH gen mutasyonunun varlığı veya yokluğu, farklı klinik ve prognoz ile korelasyon gösterir. KLL'de IgVH gen mutasyon durumunun prognostik önemi klinik evre ve genetik özelliklerden bağımsızdır (8,15,35,49). Ancak VH3-21 bölgesinde oluşan mutasyonun IgVH gen mutasyon durumundan bağımsız olarak kötü prognozu gösterdiği kanıtlanmıştır (8,49,99). IgVH gen mutasyon durumunun sabit olması ve hastalığın her döneminde aynı kalması, prognozun erken dönemde tayini için büyük önem taşımaktadır (59).

U-KLL ve M-KLL olguları, klinik seyir, tedavi gereksinimi, sitogenetik anormallikler ve sağkalım açısından farklılık göstermektedir (35). M-KLL olgularının iyi prognoza sahip oldukları, U-KLL olgularının klinik seyrinin ise daha agresif olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (8,9,11,13,34,52,101). U-KLL, ileri evre, ilerleyici klinik seyir, atipik morfoloji, kötü sitogenetik anormallikler ve tedavi direnci ile birliktedir (49). M-KLL hastaları, iyi bir klinik gidiş gösterirler, mutasyonu olmayanlara göre daha az tedaviye ihtiyaç duyarlar ve tedavisiz geçen süre daha uzundur; yaşam süreleri de, mutasyonu olmayanlara göre dikkate değer derecede uzundur. M-KLL'de ortalama sağkalım 10-25 yıl iken, U-KLL'de 5-10 yıldır (2,99). IgVH gen mutasyonu yeni ve iyi bir prognostik faktör olarak ortaya konmuştur (14,16,17).

Teknik uygulamanın zorluğundan ötürü, IgVH gen mutasyon durumunu yansıtacak biyolojik belirteçler üzerinde durulmaktadır. IgVH gen mutasyon durumu ile ilişkisi gösterilmiş belirteçler ZAP70, CD38, TK, sitidin deaminaz, lipoprotein lipaz A ve ADAM 29'dur (9,99). Özellikle CD38 ve ZAP70 ile ilişkisi incelenmiştir, ancak varolan ilişkinin mutlak bir ilişki olmadığı, bu parametrelerin her birinin bağımsız prognostik belirteç olduğu konusunda ortak görüş oluşmuştur (131). Pregerminal merkezli lösemik hücrelerde CD38 ekspresyonunun yüksek, ancak mutasyona uğramış hücrelerde düşük olduğu, IgVH mutasyonunu göstermede CD38 ekspresyonunun kullanılabileceği öne sürülmüştür. Ancak ilerleyen araştırmalarda, IgVH mutasyonu ve CD38 ekspresyonu birbirinden bağımsız prognostik faktörler olarak değerlendirilmektedir (20,21,22). IgVH mutasyonu içeren olguların, DNA "microarray"

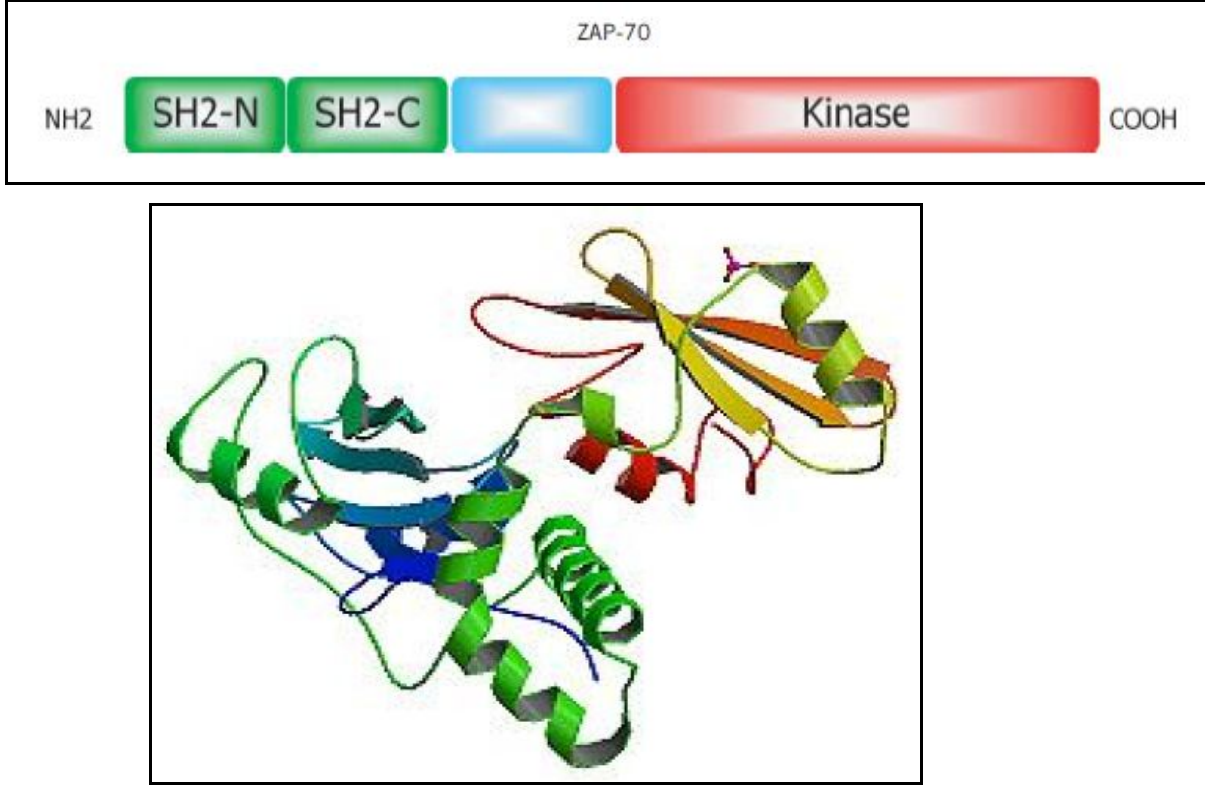
kullanılarak yapılan çalışmalarda IgVH mutasyonu içermeyenlerden bazı gen alt-grupları açısından farklılık gösterdiği ortaya konmuştur. ZAP70 gen ekspresyonunun IgVH mutasyonu ile korelasyon gösterdiği saptanmış olup, IgVH mutasyonunun olmadığı olgularda ZAP70 ekspresyonunun olduğu gözlenmiştir (21). IgVH gen mutasyonu pahalı, tespiti zor ve ancak belli merkezlerde yapılabilen bir inceleme olması nedeniyle bunun yerine, rutin laboratuvarlarda uygulanması kolay ve ucuz olan ZAP70 kullanılması düşünülmüş olup, bu konuda çalışmalar devam etmektedir (27).

2.6. İmmünohistokimyasal Markerlar

2.6.1. ZAP70 ekspresyonu

Zeta zinciri ilişkili protein kinaz 70 (ZAP70), 70 kDa ağırlığında bir proteindir ve 2. kromozomun 2q2 bölgesinde kodlanır (193). Tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir ve T hücre reseptöründen sinyal iletimiyle ilişkilidir (23).

Zeta zinciri ilişkili protein kinaz 70 üç fonksiyonel etki alanına sahip, 14 ekzondan oluşan bir gendir. 619 aminoasit uzunluğundaki 3 zincirden oluşur. Tirozin kinaz alanları, SH adında 3 ana alan içerir. SH1 bölgesi enzimatik aktivite içerir, SH2 protein-protein etkileşimini ve fosfotirozinleri tanıyarak fosforilasyonu kontrol eder. SH3, protein etkileşimleri için daha özgün tanınmaları sağlar. ZAP70'in N terminalinin sonunda iki SH2 bölgesi, karboksi terminalindeyse katalitik bölgeler bulunur. ZAP70'in SH2 bölgesi ve syk immün reseptörler üzerinde bulunan ITAM olarak adlandırılan immünreseptör tirozin tabanlı aktivasyon motiflerini özgün olarak tanır (193,194) (Şekil 4).



Sekil 4: ZAP70'in moleküler yapısı (193,194)

ZAP70 normalde T hücre ve NK hücrelerinden eksprese edilir. T hücre sinyal iletimi yanısıra T hücre gelişimi ve diferansiyasyonunda da kritik role sahiptir. ZAP70 öncelikle T hücre reseptör sinyal başlangıcında ve sonrasında T hücre aktivasyonu, apoptoz ve migrasyonunda görev alır (14,21,195). Normal B lenfositlerde bulunmaz. Ancak yapılan çalışmalarla normal tonsil ve dalaktaki aktif B fenotipli hücreler ile kemik iliği pro-B hücrelerince eksprese edildiği anlaşılmış, ayrıca KLL ve B hücreli akut lenfoblastik lösemi hücrelerinde de saptanmıştır (195). Akciğer ve barsak epitel hücrelerinde de ZAP70 ekspresyonu varlığı bilinmektedir. Periferik kana göre kemik iliğindeki KLL hücrelerinde ZAP70 ekspresyon düzeyi daha yüksektir (196).

ZAP70 ekspresyonu, Flow sitometri, Western blot, kantitatif RT-PCR, immünohistokimya gibi farklı yöntemlerle ölçülebilir (20,193). Flow sitometri hematolojik malignitelerin tanısında kullanılan kesin ve hızlı bir yöntemdir (130). Flow sitometriyle KLL hücrelerinde, T hücrelerinde ve NK hücre gruplarında, ZAP70 pozitif hücre yüzdesi analiz edilebilir (20). Zıt olarak, Western blot ve RT-PCR'da, örneklerde T hücreleri de bulunduğu için ZAP70 ekspresyonu olduğundan daha yüksek bir değerde saptanır (27).

Lösemik hücrelerde, ZAP70 ekspresyonunun %20'den fazla olması kötü prognostik özelliktir. ZAP70, KLL 'de hastalık ilerlemesi ve toplam sağkalımın önemli bir belirleyicisi olarak tanımlanmıştır (14,20,21,134). KLL hastalarında artmış B hücre reseptör (BCR) sinyali ZAP70 ekspresyonu ile ilişkilidir. Defektif BCR sinyali, ZAP70 negatif hastalarda gözlenir (195). Bir çalışmada, ZAP70 negatif olan KLL'li hastaların ortalama yaşam süreleri 24,4 yıl, ZAP70 pozitif olan hastaların ortalama yaşam süreleri 9,3 yıl olarak saptanmıştır (14). Yapılan bir çalışmada, progresyonsuz sağkalım üzerine ZAP70, CD23 ve modifiye Rai evresinin bağımsız prognostik faktör olduğu bulunmuş, toplam sağkalım açısından sadece ZAP70'in bağımsız belirleyici bir faktör olduğu rapor edilmiştir (197).

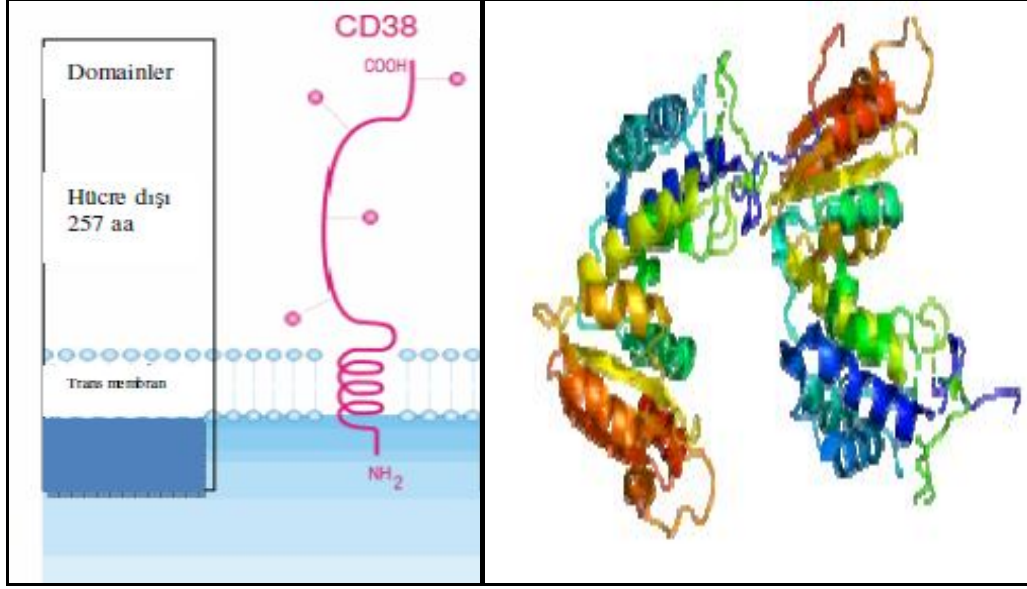
Zeta zinciri ilişkili protein kinaz 70 ekspresyonu IgVH gen mutasyon durumu arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır (20,21). ZAP70'in lösemik hücrelerdeki ekspresyonu Western blot, kantitatif RT-PCR, immünohistokimya ve flow sitometri gibi farklı metodlarla saptanabilir (198). IgVH mutasyon durumunun belirlenmesi zor ve zaman alıcı olduğu için bunun yerine ZAP70'in kullanılabileceği belirtilmektedir (20). KLL tanılı IgVH gen mutasyonu gösteren olguların büyük kısmının ZAP70 negatif, mutasyonsuz formların büyük kısmının ise ZAP70 pozitif saptandığı çalışmalar mevcuttur. Yapılan flow sitometrik çalışmalarda saptanan ZAP70 ekspresyonu ile IgVH mutasyon durumu arasında korelasyon olduğu iddia edilmekte, böylece ZAP70 ekspresyonunun IgVH mutasyon durumu ile eşdeğer bir prognostik değere sahip olabileceği düşünülmektedir (14,21,198).

Zeta zinciri ilişkili protein kinaz 70 ekspresyonu, tedavi gereksiniminin erken bir belirleyicisi olduğu gibi, bazı çalışmalarda tedaviye yanıtta da rolü olduğu gösterilmiştir. ZAP70 negatif grupta, fludarabin kemoterapisiyle tam yanıt oranı, ZAP70 pozitif gruba göre anlamlı olarak fazla bulunmuştur (197). Bazı çalışmalarda, ZAP70 pozitif hastaların ZAP70 negatif gruptaki hastalara göre daha yoğun kemoterapi gereksinimi olduğu rapor edilmiştir (5).

Zeta zinciri ilişkili protein kinaz 70 ekspresyonunun kemik iliği tutulum paternleriyle ilişkisi olduğu öne sürülmektedir. Kemik iliğinde diffüz infiltrasyonun izlendiği lösemi olgularında ZAP70 ekspresyonunun güçlü pozitif, interstisyel tutulumda değişken oranlarda pozitif, nodüler tutulumda ise negatif olduğu saptanmıştır (195).

2.6.2. CD38 Ekspresyonu

CD38, farklılaşma boyunca hematopoietik hücrelerde eksprese edilen iki fonksiyonlu bir enzimdir (199). 45 kDa molekül ağırlığında tek polipeptit zincirinden oluşan çok fonksiyonlu tip II hücre zarı proteinidir. Kısa bir N-ucu sitoplazmik kuyruğu ve uzun bir C-ucu motifi olan bir transmembran proteinidir. Dört adet azota bağlı oligosakkarit zincirine sahip olup, izoelektrik noktası 6,5 ile 6,9 arasında değişir (200) (Şekil 5).



Şekil 5: CD38 tip 2 transmembran proteinini

CD38, NAD Glikohidrolaz ADP ribozil siklaz ve ADP ribozil hidrolaz etkinliklerine sahip bir ektoenzimdir. CD38'in *Aplysia californica* olarak adlandırılan bir deniz yumusakçasındaki enzimle %30 aminoasit benzerliği gösterdiği saptanmıştır. Bu enzim Ca^{++} mobilizasyonunu sağlayan siklik ADP-riboz (cADPR) üretir. CD38 benzer enzimatik özellikler gösteren ancak, *Aplysia*'nın tersine hem siklaz hem de hidrolaz aktivitesi bulunan çift fonksiyonlu bir ektoenzimdir (201). Transmembranöz bir glikoprotein olan CD38'in enzimatik aktif bölgesi hücre dışındaki uzun kısmıdır. Ayrıca transmembranöz ve intrasitoplazmik iki bölgeye daha sahiptir. Bu molekül dimer ve tetramerler oluşturmaya eğilimlidir. Bu oligomerler CD38'in enzimatik ürünü olan cADPR'in transportunda görevlidir (199,201).

CD38'i kodlayan gen insanda dördüncü kromozomda (4p15) yer almaktadır. CD38 cDNA'sı bir T hücre soyundan klonlanmıştır. İnsan CD38 geni tek kopya halinde bulunur. 62 kb'ın üzerinde bir bölgede sıralanmış sekiz ekzon ve yedi introndan oluşur. 5' ucundaki kodlayan bölgeyi bölen intron çok büyüktür (200,202).

İnsan CD38'i olgunlaşmamış hematopoietik hücreler tarafından eksprese edilen, T hücreleri, B hücreleri, dendritik hücreler ve NK hücreleri gibi aktive edilmiş lenfositler tarafından

yüksek seviyede yeniden düzenlenmiş bir tip II yüzey antijenidir. Tam uzunlukta bir insan CD38'inin kısa intrasellüler bir domaini ve önemli derecede geniş bir ekstrasellüler parça tarafından takip edilen tek transmembran heliks içeren 300 aminoasit kalıntısı vardır (202). CD38, immatür B hücre progenitörleri, bazı germinal merkez hücreleri ve aktive lenfositler yanı sıra plazma hücrelerinde eksprese edilirken, matür B hücrelerinde oldukça zayıf ekspresyon söz konusudur. Bu ekspresyon paterni B ve T lenfositlerinin aktifleşme ve farklılaşma belirteci olarak, lenfosit gelişiminin farklı evrelerini belirlemede kullanılabilir (201). Lenfoid ve myeloid hücrelerin CD38 ekspresyonu bu hücrelerin farklı tiplerinde farklı ölçüde gerçekleşir (200). NK hücrelerinin ve monositlerin yaklaşık %80'i CD38 pozitif bulunmuştur. Kemik iliğinde ise CD38, öncül hücrelerde bulunur (203). Ayrıca göz, karaciğer, pankreas, beyin, akciğer ve prostat gibi hemopoietik sistem dışındaki dokularda da CD38 ekspresyonu bulunmuştur (201) (Tablo 10).

Tablo 10: CD38'in bulunduğu hücre ve dokular (203)
Gelişim odağında (germinal merkezde)bulunan B hücreleri
Medüller timositler
Aktiflenmiş T hücreleri
Plazma hücreleri
Monosit / makrofajlar
Doğal öldürücü hücreler
Eritrositler
Trombositler
Ortak hematopoietik kök hücreler
Barsak lamina propria lenfositleri
İskelet ve kalp kası hücreleri
Böbrek kıvrıntılı tübül hücreleri
Sinir hücreleri
Prostat epiteli
Birçok tümör hücrelerinde

CD38'in membrana bağlı biçiminin yanı sıra sıvıda çözünmüş biçimi de (sCD38) vardır. Çözünmüş molekül, aktiflenmiş T hücre kültürleri ve CD38 pozitif tümör hücre soylarının üst sıvılarında saptanabilir. sCD38, serum, amniyon sıvısı gibi normal ve myeloma hastaların serum ve asit sıvıları, kanserli hasta serumları gibi patolojik sıvılarda da gösterilebilir (204). CD38'in bu sıvı molekül formları myelom ve bazı diğer maligniteleri olan hastaların vücut sıvılarında bulunan çözünür özellikteki 39kDa'luk formu ve X'e bağlı agammaglobulinemili hastaların serumunda bulunan 78kDa'luk formudur (18,201). Önceleri yalnızca hücre yüzeyinde

olduğu düşünölen CD38, şimdilerde hücre içinde mitokondri, endoplazmik retikulum, nükleer zarf ve sitozol gibi farklı lokalizasyonlarda da saptanmıştır (201).

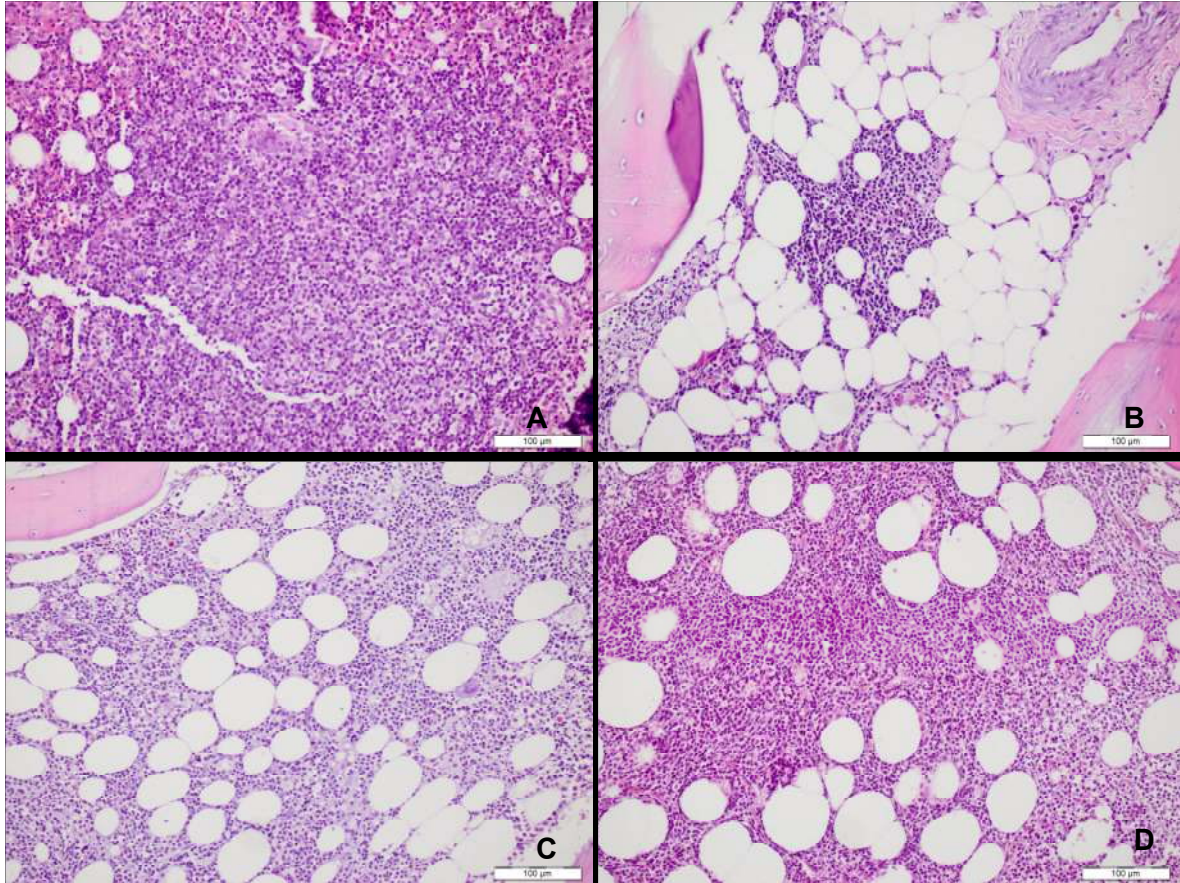
Yapılan birçok çalışma yüksek CD38 düzeyinin kötü prognoz belirtisi olduğuna işaret etmektedir. HIV-1 infeksiyonunda CD38 ekspresyonu artmaktadır (203). Myeloma hücrelerinde özgün olarak CD38 ekspresyonu gözlenir. Böylece risin A' ya bağlanmış monoklonal antikorlarla myeloma hücrelerini hedef almak ve öldürmek mümkündür. İn vivo yapılan çalışmalarda bu yönde sonuçlar alınmıştır (205).

KLL'de prognostik önemi olan IgVH mutasyonu ile CD38 arasında korelasyon olduğu söylenmektedir. CD38'in negatif prognostik faktör olduğu ve mutasyonsuz IgVH genine sahip KLL hastalarında eksprese edildiği gözlenmiştir (18,201). CD38 ekspresyonu ile kompleks sitogenetik anomaliler arasında da korelasyon olduğu bildirilmektedir. 13q delesyonu ile CD38 negatifliğinin, 11q ve 17p delesyonu ile de CD38 pozitifliğinin korele olduğu öne sürölmüştür (59).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Olgular

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında 2007-2011 yılları arasında kemik iliği biopsisiyle tanıları konmuş 84 KLL olgusu çalışmaya alındı. Olguların yaş, cinsiyet, lenf nodu tutulumu, klinik evre, tedavi durumu ve eşlik eden diğer patolojik tanılar gibi bilgileri hasta dosyalarından elde edilerek kaydedildi. H&E ile boyalı preparatları tekrar gözden geçirilerek kemik iliği tutulum paternleri (diffüz, nodüler, interstisyel, mikst) belirlendi (Resim 2). Gerek doku preparatlarındaki histopatolojik özellikler, gerekse Giemsa ile boyanmış aspirasyon yayma ve imprint preparatlarındaki hücre özellikleri gözden geçirildikten sonra her bir olgu için CD3, CD5, CD10, CD20, CD 23, ve siklin-D1 ekspresyonları değerlendirilerek tanılar doğrulandı.



Resim 2: Kemik iliği infiltrasyon paternleri: A) diffüz, B) nodüler, C) interstisyel ve D) mikst tutulum. (H&E, X200)

Kronik lenfositik lösemi tanısı için National Cancer Institute Working Group (NCI-WG) tanı ölçütleri kullanıldı. Buna göre;

1. Çevre kanında lenfositoz ($>5 \times 10^9/L$): En az bir aydır devam etmesi gerekmektedir.
2. Lenfositlerin morfolojik olarak olgun görünümlü olması
3. Flowsitometrik incelemede lenfositlerde immünofenotipik olarak aşağıda belirtilen özelliklerin saptanması
 - a. CD5 ve CD19 ile birlikte CD23 ekspresyonu
 - b. Düşük derecede CD20, CD22 ve CD79b ekspresyonu
 - c. Düşük derecede sIg ekspresyonu IgM+/- (IgD)
 - d. Her B hücresinin yüzeyinde tek tip hafif zincir ekspresyonu (kappa veya lambda)
 - e. CD10, Siklin D1 ve FMC7 ekspresyonunun olmaması, değerlendirildi.

Binet evreleme sistemine göre klinik evreleme yapıldı:

Evre A: Hb: >10 gr/dl , Plt sayısı: >100.000 mm³, tutulan lenfoid bölge: <2

Evre B: Hb: >10 gr/dl , Plt sayısı: >100.000 mm³, tutulan lenfoid bölge: >2

Evre C: Hb: <10 gr/dl , Plt sayısı: <100.000 mm³, tutulan lenfoid bölge:bağımsız

3.1. İmmünohistokimyasal Boyama

Olguların bloklarından elde edilen yeni kesitlerde ZAP70 ve CD38 ekspresyonu araştırıldı. İmmünohistokimyasal boyama Avidin-Biyotin kompleks sistemi (ABC) kullanılarak yapıldı. Bu sisteme göre;

1-Poly-L-lysin kaplı lama (Thermo scientific superfrost plus) alınan kesitler bir gece 37 derecelik etüvde bekletildi.

2-30 dakika 56 derecelik etüvde bulunan ksilolde, 15 dakika oda sıcaklığındaki ksilolde deparafinize edildi.

3-Azalan oranlarda alkol serilerinde rehidrate edildi.

4-Kesitler önceden hazırlanmış olan pH:7,2 olan phosphate-bufferd-saline(PBS) solüsyonunda beş dakika bekletildi.

5-Endojen peroksidaz aktivitesinin bloke edilebilmesi için, kesitlere süper blok (Sensi Tek HRP anti-polyvalent, AAA125) damlatılarak beş dakika bekletildi.

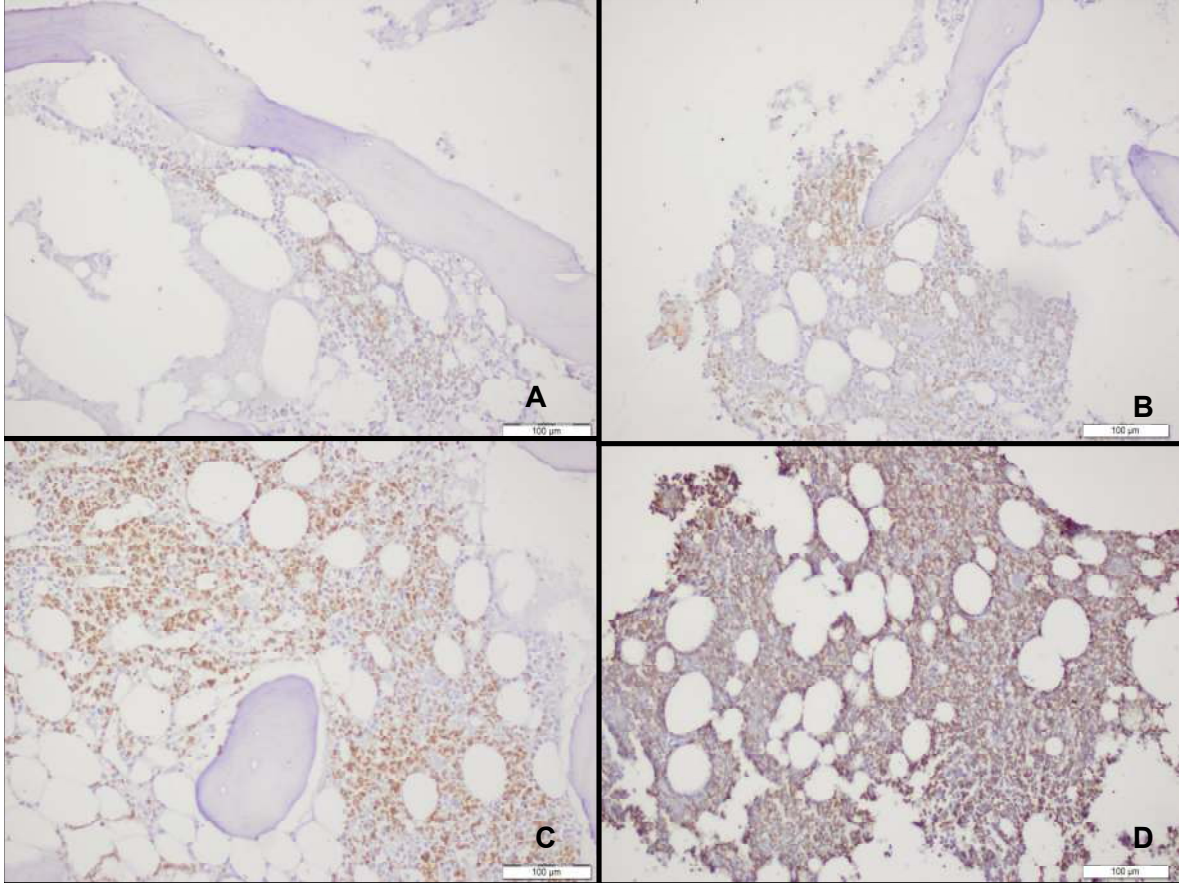
6-Kesitler beş dakika PBS solüsyonunda yıkandı.

7-Dako PTlink cihazında retrieval solusyonu kullanılarak (Dako Envision Flex Target retrieval solution High ph 50x) 95 derecede 20 dakika inkübe edildi. Böylece antijenin açığa çıkarılması sağlandı.

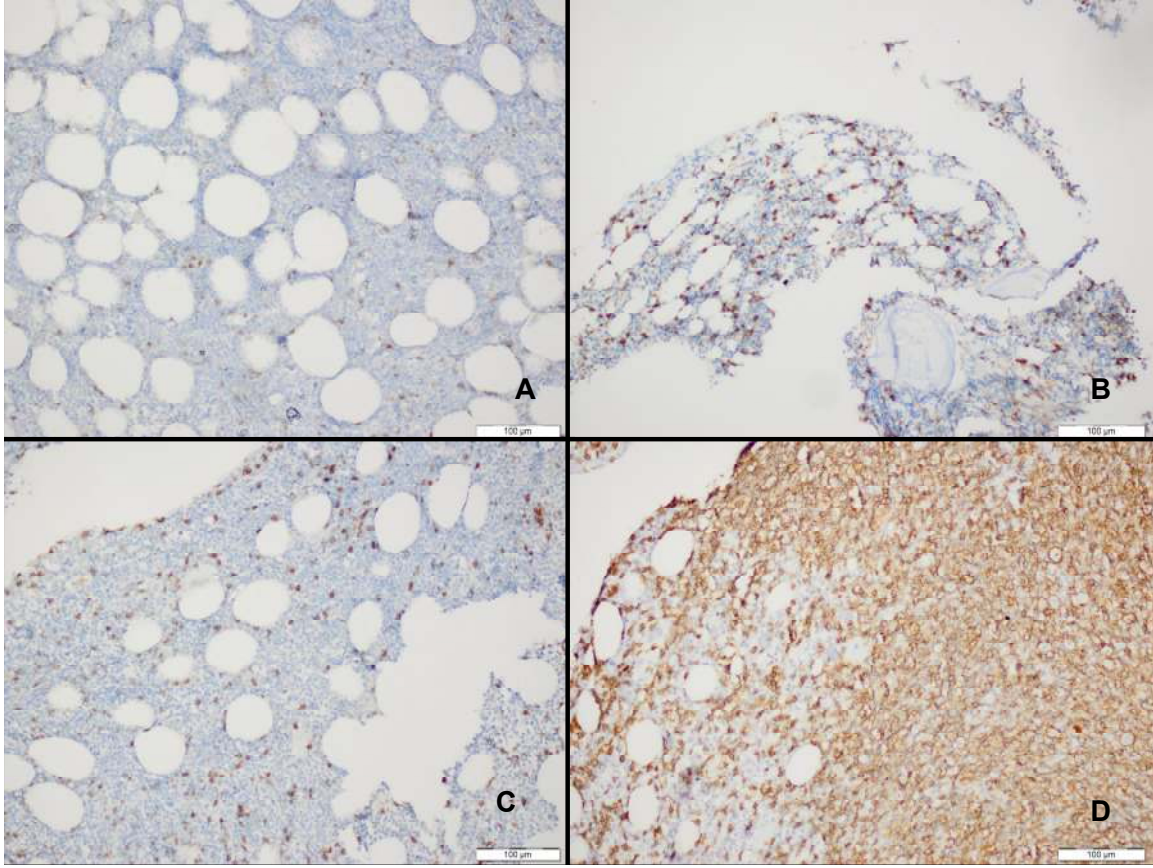
- 8-Kaynatmadan sonra kesitler oda ısısında soğumaya bırakıldı.
- 9-Kesitler beş dakika PBS solüsyonunda yıkandı ve kurulandı.
- 10-Her bir kesitin üzerine primer antikorlar olan ZAP70 (Santa Cruz Biotechnology, Sc-1526, 200ug/ml, 1/400 dilüsyon) ve CD38 (Santa Cruz Biotechnology, Sc-7325, 200ug/ml, 1/300 dilüsyon) solüsyonu dokuyu tamamen örtecek şekilde damlatıldı ve bir saat bekletildi.
- 11-Kesitler beş dakika PBS solüsyonunda yıkanarak bağlanmış antikorlar uzaklaştırıldı.
- 12-Biyotine bağlayıcı sekonder antikor (Sensi Tek HRP, ABF 125) eklendi ve 10 dakika bekletildi.
- 13-Kesitler beş dakika PBS solüsyonunda yıkandı ve kurulandı.
- 14-Kesitlere Streptavidin HRP solüsyonu (Sensi Tek HRP, ABG125) damlatılarak 10 dakika bekletildi.
- 15-Kesitler beş dakika PBS solüsyonunda yıkandı.
- 16-Renk verecek görüntüyü sağlamak amacı ile Diaminobenzidin tetraklorid, (DAB) (Thermo scientific 125 ml, HD19114) damlatıldı ve kahverenk gözlenene kadar bekletildi.
- 17-Çeşme suyunda beş dakika yıkandı.
- 18-Zemin boyanması için kesitlere hematoksilin ile zıt boyama yapıldı.
- 19-Çeşme suyunda beş dakika yıkandı.
- 20-Dehidratasyon için kesitler sırası ile yükselen oranlarda alkol serilerinden geçirildi ve ksilolde saydamlaştırma sonrası balsam ile kaplandı.

Boyanma oranlarının saptanması

ZAP70 ve CD38 için pozitif kontrol olarak önceden pozitifliği bilinen tonsil dokusuna ait kesitler kullanıldı. Tüm değerlendirmeler ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Tokyo, Japan) 10, 20 ve 40'lık büyütmelemlerde yapıldı. ZAP70 için sitoplazmik boyanma, CD38 için membranöz boyanma dikkate alındı. Skorumlama işlemi, boyanmanın en yoğun olduğu tümör alanlarında birbirine komşu en az 200 tümör hücresinin sayılması ve bunlar içerisinde boyananların boyanma göstermeyenlere oranlarının hesaplanmasıyla yapıldı. Bulunan oranlar ZAP70 için <%25 ise 0; %25-50 arasındaysa 1; %51-75 arasındaysa 2 ve >%75 ise 3 puan verilerek skorlandı (Resim 3). CD38 için ise aynı puanlar sırasıyla <%10; %11-20; %21-30 ve >%30 oranları için uygulandı (Resim 4). ZAP70 için %25 ve üzeri, CD38 için %30 ve üzeri boyanmalar pozitif kabul edildi (206).



Resim 3: ZAP70 ile boyanma oranları: A) <%25 pozitif, B) %25-50 pozitif, C) % 51-75 pozitif, D) >%75 pozitif. (Anti-ZAP70, X200)



Resim 4: CD38 ile boyanma oranları: A) <%10, B) %11-20, C) %21-30, D) >%30 (Anti-CD38, X200)

3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Sekans analizi

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) moleküler biyolojide uygulanan bir teknik olup, nükleik asitlerin uygun koşullarda hızlı bir şekilde çoğaltılması olarak tanımlanabilir.

Polimeraz zincir reaksiyonu bir çeşit invitro klonlamadır. PCR reaksiyonu DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasına (denatürasyon), daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasına (hibridizasyon), sonra da zincirin uzamasına (polimerizasyon) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım (denatürasyon / hibridizasyon/polimerizasyon) bir PCR siklusunu oluşturur. Her adım farklı ısılarda gerçekleştirilir. PCR'ı uygulayıp amplifikasyon yapmak için, DNA örneği (FFPE doku, kan vs izole edilmiş), çoğaltılacak olan bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer, dNTP'ler (A,T,C,G), ısıya dayanıklı DNA-Polimeraz enzimi, uygun pH ve iyon koşullarını (Mg²⁺) sağlayan tampon karışımı gereklidir. PCR, çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamaktadır. PCR tekniği ile laboratuvar çalışmalarında çok büyük hız ve kesinlik kazanılmıştır.

Parafine gömülü dokudan DNA izolasyonu

Parafine gömülü dokudan DNA izolasyonu ve sonrasında PCR optimizasyonu Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik anabilim dalında yapıldı. DNA izolasyonu için INVITROGEN QUANT-IT DSDNA FFPE Tissue Kit kullanıldı. Parafine gömülü dokudan DNA izolasyonunda aşağıdaki basamaklar uygulandı.

1-84 vakaya ait Parafine gömülü dokulardan 10 mikrometre kalınlığında 5'er adet kesit alındı ve 1,5 ml'lik ependorf tüpe konuldu.

2-Pipetör ile 1 ml ksilen eklendi. Tüpün kapağı kapatılıp, vorteks ile 10 saniye karıştırıldı. Tüp mikrosantrifüje dengeleyici ile karşılıklı olarak yerleştirildi. Oda ısısında 3 dakika son hızda (14.000rpm) santrifüj edildi.

3-Pipetör ile peleti koruyacak şekilde, dikkatlice, süpernetant uzaklaştırıldı.

4-Pipetör ile tüpe 1 ml %100 etanol eklendi. Tüpün kapağı kapatıldı. Vorteks ile 10 saniye karıştırıldı.

5-Tüp mikrosantrifüje dengeleyici ile karşılıklı olarak yerleştirildi. Oda ısısında 3 dakika son hızda (14.000rpm) santrifüj edildi.

6-Pipetör ile peleti koruyacak şekilde, dikkatlice, süpernetant uzaklaştırıldı.

7-Tüpün kapağı açıldı. Tüpteki etanol buharlaşmaya bırakıldı (5-10 dakika).

8-50-200 mikrolitre hacimli pipetör ve uygun uç kullanarak tüpe 180 mikrolitre Genomic Digestion Buffer ve 20 mikrolitre Proteinase K eklendi. Vorteks ile 10 saniye karıştırıldı.

9-Tüp 56 °C 'deki su banyosuna yerleştirildi. Bir gece inkübe edildi.

10-Tüp inkübasyondan alındı. Oda ısısında 3 dakika son hızda (14.000rpm) santrifüj edildi. Tüp mikrosantrifüj cihazından alındı. Kapağı açıldı. Lizat yeni bir 1,5 ml'lik ependorf tüpe konuldu.

11-50-200 mikrolitre hacimli pipetör ve uygun uç kullanarak 20 mikrolitre RNase A eklendi. 10 saniye vorteksle karıştırıldı. Oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.

12-Ardından 50-200 mikrolitre hacimli pipetör ve uygun uç kullanarak 200 mikrolitre Purelink Genomic Lysis/binding Buffer eklendi. 10 saniye vorteksle karıştırıldı.

13- 50-200 mikrolitre hacimli pipetör ve uygun uç kullanarak 200 mikrolitre %100 etanol eklendi. Tüpün kapağı kapatıldı. Vorteks ile 10 saniye karıştırıldı

12- Uygun pipetör ve uç kullanarak bu karışım tüpten alındı. Purelink Spine column Tube kolonuna yüklendi. Kolonun kapağı kapatıldı.

13- Tüp mikrosantrifüje dengeleyici ile karşılıklı olarak yerleştirildi. Oda ısısında 12200rpm hızda 3 dakika santrifüj edildi.

14- Tüp santrifüjden alındı. Filtratı içeren toplayıcı tüpü atıldı. MinElute kolonu 2 ml.'lik yeni bir toplayıcı tüpün içine yerleştirildi.

- 15- Purelink Spine column Tube kolonunun kapağı açıldı. Uygun pipetör ve uç kullanarak 500 mikrolitre Wash Buffer 1 eklendi. Kolonun kapağı kapatıldı.
- 16- Tüp mikrosantrifüje dengeleyici ile karşılıklı olarak yerleştirildi. Oda ısısında 12200 rpm hızda 3 dakika santrifüj edildi.
- 17- Tüp santrifüjden alındı. Toplama tüpünde biriken filtratı atıldı. Kolonu yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Uygun pipetör ve uç kullanarak 500 mikrolitre Wash Buffer 2 eklendi. Kolonun kapağı kapatıldı.
- 18- Tüp santrifüje dengeleyici ile karşılıklı olarak yerleştirildi. Oda ısısında 14.000rpm hızda 3 dakika santrifüj edildi.
- 19- Tüp santrifüjden alındı. Toplama tüpünde biriken filtratı atıldı. Kolonu 2 ml'lik yeni tüpe yerleştirildi. QIAamp MinElute kolonun kapağı açıldı. Uygun pipetör ve uç kullanarak 20-100 mikrolitre Genomic Elution Buffer (tam merkeze gelecek şekilde) eklendi.
- 20- Tüp bu hali ile dikey konumda oda ısısında 5 dakika bekletildi.
- 21- Sonra yeniden santrifüje dengeleyici ile karşılıklı yerleştirildi. Oda ısısında son hızda (14.000rpm) 3 dakika santrifüj edildi.

DNA konsantrasyonu ve saflığının ölçümü

DNA'nın kantitatif ölçümü için Nano Drop 2000 kullanıldı. Cihaz distile su ile standardize edildikten sonra uygun pipetör ve uç kullanarak izole edilen DNA'dan 2 mikrolitre konuldu. OD 260/280 hesaplanarak temizlik derecesi saptandı. 50 vakadan yapılan DNA izolasyonu sonrası nanodropta ideal değeri 1,8 civarında olan 20 vakanın PCR reaksiyonu ve sekans analizi yapıldı.

Polimeraz zincir reaksiyonu

PCR reaksiyonu ve sekans analizi İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde çalışıldı. Tüm örneklerden IgVH mutasyonunun (14q32.3) tesbit edilmesi BIOMED-2 (189) primerleri kullanılarak yapıldı. Mutasyonların tesbiti için yaklaşık 260 bp boyutlarında FRII bölgesi V1-7 segmentlerinin 7 adet forward primeri ve 1 adet JH reverse primer kullanıldı.

Forward primerler:

Vh1-FR2	(1-2)	(-192)	CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA
Vh2-FR2	(2-5)	(-190)	TGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGG
Vh3-FR2	(3-7)	(-189)	GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA
Vh4-FR2	(4-4)	(-188)	TGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG
Vh5-FR2	(5-51)	(-190)	GGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAGG
Vh6-FR2	(6-1)	(-194)	TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAG
Vh7-FR2	(7)	(-192)	TTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA

Reverse primer:

JH consensus 3' CCAGTGGCAGAGGAGTCCATTC 5'

Tüm primerler klasik PCR yöntemi ile çalışıldı. Bir forward primer ve reverse primerden koymak üzere bir hasta için 7 PCR tüpü hazırlandı. Her tüpte hazırlanan PCR karışımı aşağıdaki gibidir:

1xTaq Buffer

2mM dNTP karışımı (dATP+dCTP+dGTP+dTTP)

1.5 mM MgCl₂

0.2 mM bir forward primer

0.2 mM reverse primer

0.5 U/ reaxn Taq enzim

DNA (100nmol)

Son hacim su ile tamamlandı. Toplam 20 mikrolitrelik PCR karışımı elde edildi.

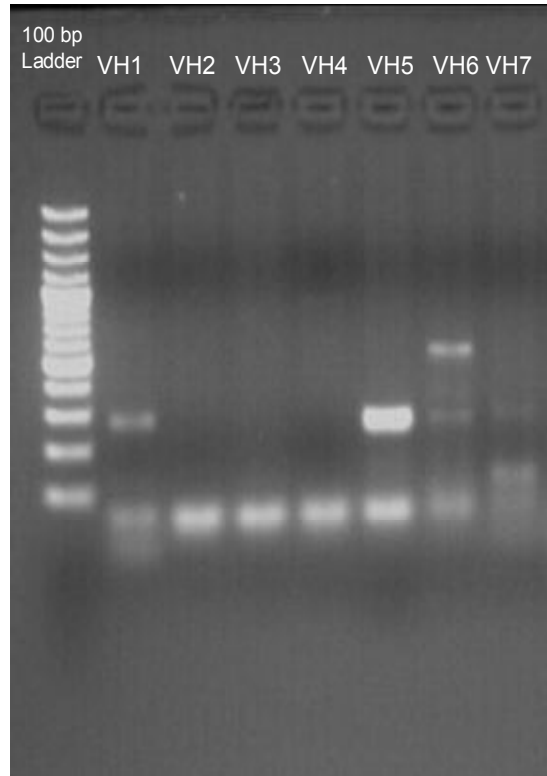
Polimeraz zincir reaksiyonunun siklusları şu şekilde düzenlendi: Birinci denatürasyon (94°C'de 7 dakika), 35 devirlik denatürasyon (94°C'de 1 dakika), bağlanma (58°C'de 1 dakika) ve elongasyon (72°C'de 1,5 dakika). Son siklustan sonra bir final uzama (72°C'de 10 dakika) eklendi. Bundan sonra örnekler 4°C'de saklandı.

Jelde yürütme ve görüntüleme

Elektroforez sulu bir çözelti içinde küçük elektrik yüklü parçacıkların, uygulanan bir elektrik alanının etkisi ile göç etmesi esasına dayanır. DNA'nın negatif yüklü olması katottan anota doğru ilerlemesine neden olur. Aynı jelle büyüklüğü bilinen bir belirteç DNA (marker) koyulur ve elektroforez sonunda oluşan bantların konumları karşılaştırılarak değerlendirilir. Jel olarak genellikle agaroz jel kullanılır.

Bu çalışmada görüntüleme için %2'lik agaroz (Prona Basic Agarose) jel hazırlandı. 1 gr agaroz tartılarak üzerine 50 ml (1X) TAE tamponu ilave edildi. Mikrodalgada (Galanx, EN025, Seri No:020205) kaynatılarak çözünmesi sağlandı. Jel çözeltisi soğumadan önce üzerine 5 mikrolitre Etidium Bromid (Sigma) eklenerek karıştırıldı. Bu karışım, tarakları yerleştirilmiş jel kalıplarına

hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü ve donması sağlandı. Daha sonra elektroforez tankı (THERMO mini jel elektroforez sistemi) TAE tamponu ile dolduruldu ve jel elektroforez tankına alındı. Jel tarakları ile jelde oluşturulan 20 mikrolitrelik boşluklara, her bir örnek için 2 mikrolitre boya çözeltisi (GeneRuler-Fermentas- loading dye solution 6X) ve 10 mikrolitre PCR ürünü eklenerek pipetaj yapıldı ve jel yükleme işlemi tamamlandı. Ayrıca ilk boşluğa da oluşan ürünün uzunluğunu ölçmek amacıyla DNA ladder (Fermentas Gene Ruler 100bp DNA Ladder, kod:SM0323) yüklendi. Elektroforez tankı 100voltluk, 2 amper akıma 30 dakika süre ile bağlandı. İşlem sonunda, çoğaltılan bantlar “marker” ile karşılaştırılmak üzere UV-transilluminatörde kontrol edildi ve fotoğraf çekildi (Vilber Lourmat jel görüntüleme sistemi). Jelde görüntüyü değerlendirirken mutasyon varlığında 250-300 bp aralığında bant oluşumu izlendi. Mutasyon yokluğunda ise bu aralıkta bant oluşumu gözlenmedi (Resim 5).

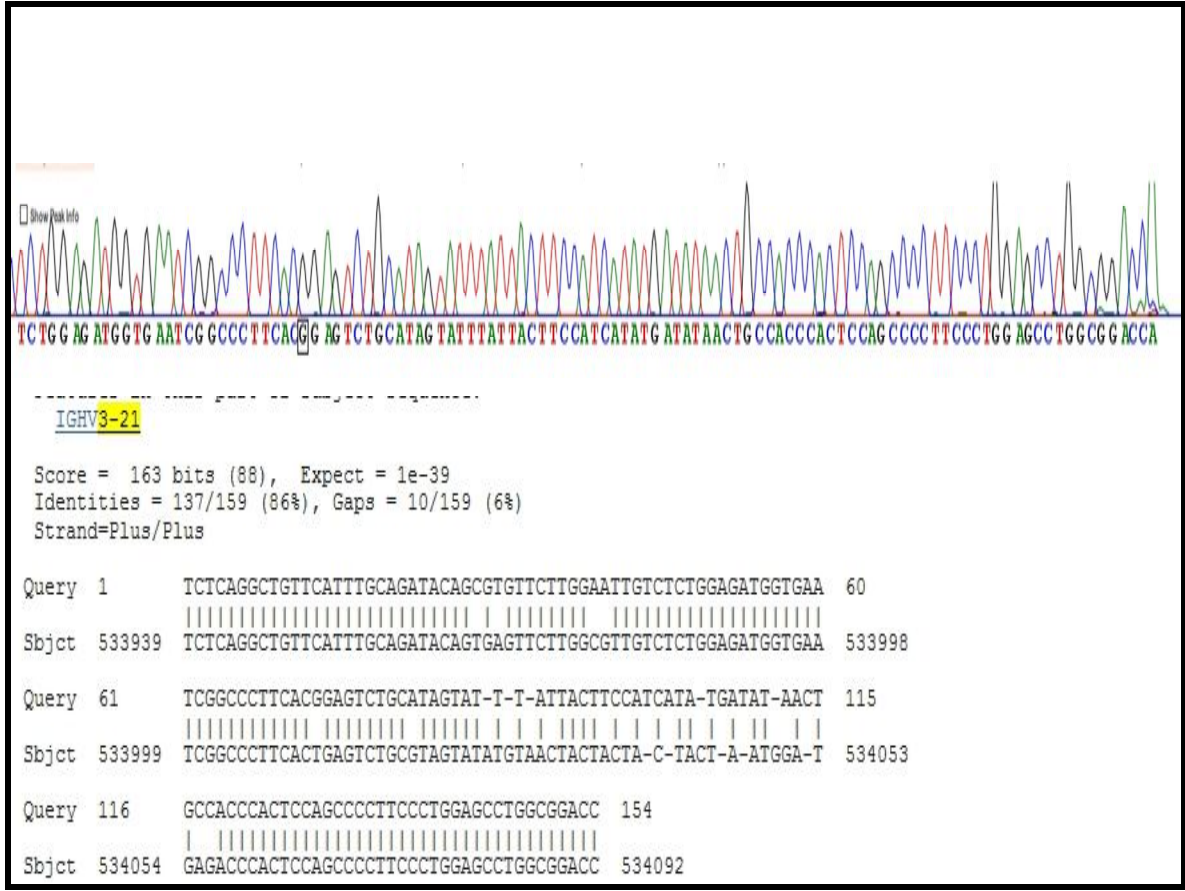


Resim 5: VH1 ve VH5 primerlerinde 250-300bp aralığında bant oluşumu izlenen bir hastaya ait jel görüntüsü

Sekans analizi

Sekans analizi öncesi PCR ürünü, sephadex (Sigma sephadex G50) yüklü spin kolonda temizlendi ve nanodrop cihazında ölçülerek konsantrasyonuna ve saflığına bakıldı. Örneği sekansa hazırlamak için cycle sequence reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu reaksiyonda, floresans based cycle sequencing reaksiyonları için kullanıma hazır bir karışım olan BigDye Terminator v3.1 adlı cycle sequencing kiti kullanıldı. Cycle sekans PCR reaksiyonu için karışımın içeriği: 2µl BigDye Terminator, 4µl dH₂O, 1µl BigDye sequencing buffer, 1µl (3,2 pmol/µl) primer ve 2µl DNA şeklindedir. DNA konsantrasyonu örneğin boyutuna göre değişmektedir. Bu çalışmada yaklaşık 20ng kullanıldı. 10µl hacimli PCR karışımı hazırlandıktan sonra 96°C'de 1 dakika denatürasyon sonrası, 30 cycle'lık 96°C'de 10 saniye, 58 °C'de 5 saniye, 60°C'de 4 dakika PCR yapıldı. Cycle sequencing reaksiyonu bitince ürünler tekrar sephadex spin kolonda temizlendi ve Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazında sekanslanmak üzere cihaza spesifik 96'lık well plate'e yüklendi.

Elde edilen sekans sonuçları NCBI-Blast(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>.) ve VBASE (<http://www.vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) database kullanılarak karşılaştırıldı. %98 ve altı homoloji mutasyonlu kabul edildi (Resim 6).



Resim 6: VH3 (3-21) primerinde mutasyon saptanan bir hastaya ait sekans görüntüsü ve database ile karşılaştırılması

3.3. İstatistiksel değerlendirme

İstatistik çalışmaları SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 14.0 for Windows programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistiklerde sayı ve yüzde, gruplar arası karşılaştırmalarda Ki kare ve Fisher'in kesin testi, farklılık hesaplamalarında paired samples t-test, korelasyon hesaplamalarında Pearson korelasyon testi ve sağkalım istatistiklerinde Kaplan Meier testi kullanıldı. Anlamlılık seviyesi olarak 0,05 alınmış olup, p degerinin <0,05 olması durumunda farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtildi.

4.BULGULAR

Bu çalışmada beş senelik süre içerisinde tanı alan toplam 84 KLL olgusu, biyopsi örneğindeki kemik iliği infiltrasyon paterni, ZAP70 ve CD38 ekspresyonu yanısıra IgVH mutasyon durumu açısından incelendi. Ayrıca bu parametrelerin 1-50 aylık (ort. 13,452±12,714) izlem süresi içerisinde sağkalım ile ilişkileri araştırıldı. Olgulara ait genel özellikler Tablo 11’de sunulmaktadır.

Tablo 11: Olguların genel özellikleri

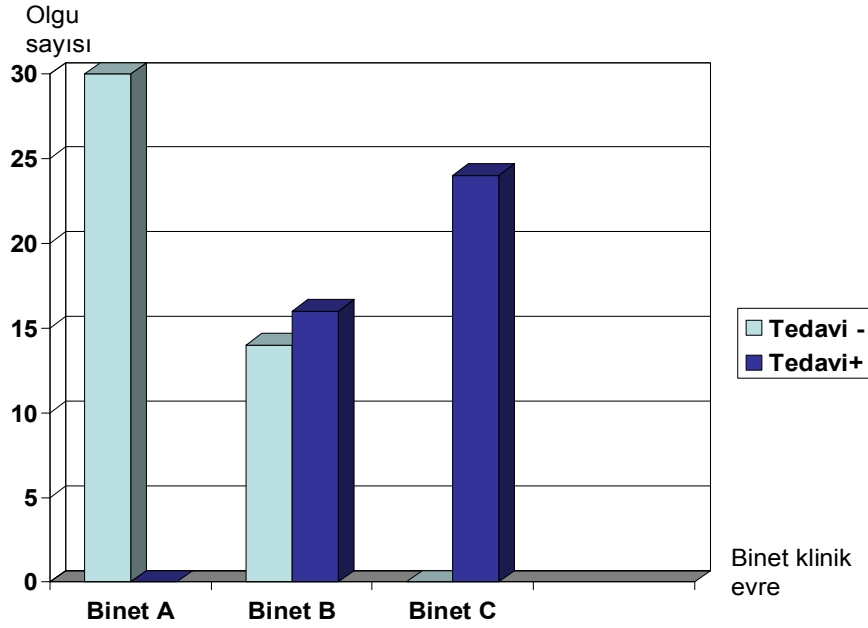
Özellikler	N=84
Yaş	ort. 65.36±12,5
Cinsiyet	29 Kadın (%34,5) 55 Erkek (%65,5)
Binet Klinik Evre	32 hasta (%38,1) Evre A 28 hasta (%33,3) Evre B 24 hasta (%28,6) Evre C
Tanı sonrası tedavi gereksinimi	40 hasta (%47,6)
Tedavisiz izlem	44 hasta (%52,4)
Prognoz	30 Remisyon(?) (%35,7) 44 Tedavisiz izlem (52,4) 10 Ölüm (%11,9)
Kemik iliği infiltrasyon paterni	38 Diffüz (%45,2) 10 Nodüler (%11,9) 29 İnterstisyel (%34,5) 7 Mikst (%8,3)
ZAP70 (+/-) eşik değer %25	45/39
CD38 (+/-) eşik değer %30	25/59
IgVH mutasyon Durumu (+/-) eşik değer %98	6/20

Çalışmaya alınan olguların en genci 35, en yaşlısı 89 yaşında idi (ort. 65.36±12,5). En büyük olgu grubunun altıncı ve yedinci dekadlarda bulunduğu görüldü. Olguların 29'u kadın, 55'i erkekti. Olguların dekadlara göre yaş ve cinsiyet dağılımı Tablo 12'de sunulmaktadır.

Tablo 12: Olguların dekadlara göre yaş ve cinsiyet dağılımı

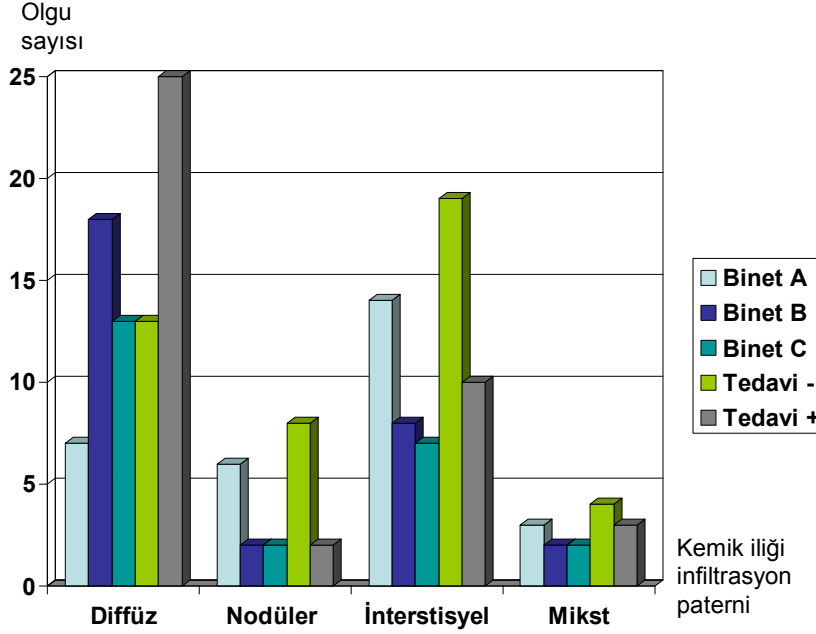
Yaş (%)	Cinsiyet		Toplam	Toplam %
	Kadın (%)	Erkek (%)		
40 yaş altı	0 (%0)	2 (%3,6)	2	%2,4
40-49 yaş aralığı	2 (%6,9)	6 (%10,9)	8	%9,5
50-59 yaş aralığı	7 (%24,1)	10 (%18,2)	17	%20,2
60-69 yaş aralığı	7 (%24,1)	16 (%29,1)	23	%27,4
70-79 yaş aralığı	9 (%31)	14 (%25,5)	23	%27,4
80 yaş üzeri	4 (%13,8)	7 (%14,1)	11	%13,1
Toplam	29	55	84	

Olguların Binet klinik evre açısından dağılımına bakıldığında 32 hasta (%38,1) Evre A, 28 hasta (%33,3) Evre B, 24 hasta (%28,6) Evre C olarak değerlendirildi. Binet klinik evre ile yaş ($p=0,285$) ve cinsiyet ($p=0,720$) arasında, anlamlı farklılık bulunmadı. Klinik evre ile tanı sonrası tedavi gereksinimi arasında (Şekil 6), anlamlı farklılık olduğu ve ileri evre hastaların daha erken tedaviye ihtiyaç duydukları gözlemlendi. ($p=0,000$)



Şekil 6 : Olguların Binet klinik evreye göre tedavi durumlarının dağılımı

Kemik iliği infiltrasyon paterni açısından olguların 38'inde (% 45,2) diffüz, 29'unda (%34,5) interstisyel, 10'unda (%11,9) nodüler ve 7'sinde (%8,3) mikst tutulum gözlemlendi. Kemik iliği infiltrasyon paterni ile yaş ($p=0,272$) ve cinsiyet ($p=0,313$) arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Yapılan istatistiksel çalışmalarda kemik iliği infiltrasyon paterni ile klinik evre ve tanı sonrası tedavi gereksinimi arasında, anlamlı farklılık saptandı. Kemik iliğinde diffüz infiltrasyon gösteren hastaların tanı sonrası erken tedavi gereksinimi olduğu ($p=0,019$) ve Binet klinik evre açısından ileri evre hastalar olduğu ($p=0,000$) gözlemlendi (Şekil 7).



Şekil 7: Olguların kemik iliği infiltrasyon paternlerine göre Binet klinik evre ve tedavi durumlarının dağılımı

İmmünhistokimyasal boyanma özellikleri:

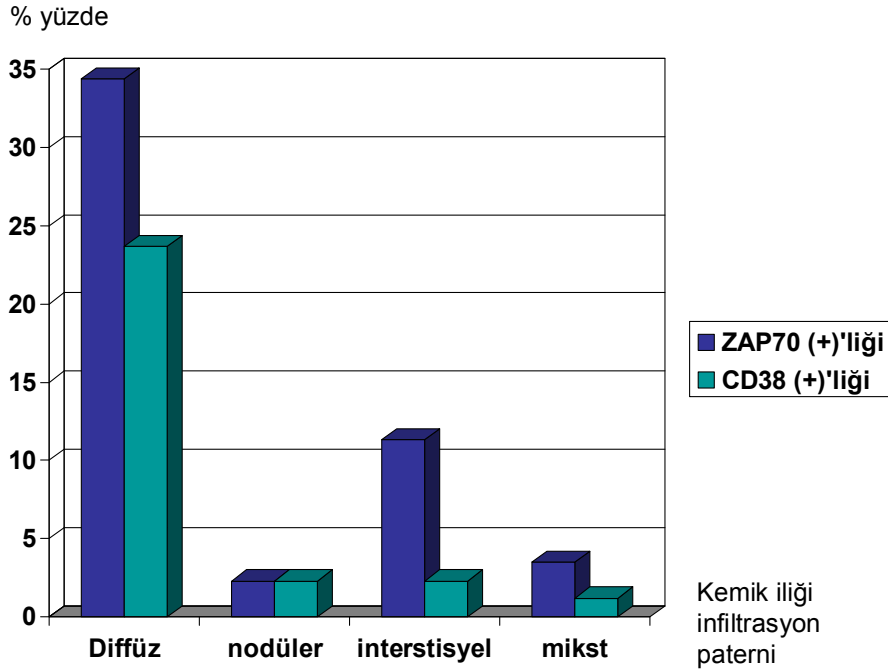
İmmünhistokimyasal yöntemle uygulanan ZAP70 boyasında 45 (%53,6) olguda pozitif, 39 (%46,4) olguda negatif boyanma tespit edildi. ZAP70 pozitifliği ile yaş ($p=0,200$), cinsiyet ($p=0,243$) ve Binet klinik evre ($p=0,068$) arasındaki ilişki incelendiğinde; anlamlı farklılık bulunmadı. Tanı sonrası tedavi gereksinimi ile ZAP70 pozitifliği arasında anlamlı farklılık saptandı. ZAP70 boyanması gösteren olguların tanı sonrasında daha erken tedavi gereksinimi olduğu gözlemlendi ($p=0,046$).

İmmünhistokimyasal yöntemle uygulanan CD38 boyasında 25 (%29,8) olguda pozitif, 59 (%70,2) olguda negatif boyanma tespit edildi. CD38 pozitifliği ile yaş ($p=0,186$), cinsiyet ($p=0,751$), Binet klinik evre ($p=0,221$) ve tanı sonrası tedavi gereksinimi ($p=0,139$) arasında anlamlı farklılık bulunmadı.

Kemik iliği infiltrasyon paterni ile ZAP70 ve CD38 ekspresyonları arasındaki ilişki incelendiğinde (Şekil 8), her iki immünhistokimyasal marker ile sentezin diffüz tutulumunda nodüler, interstisyel ve mikst tutulumu göre anlamlı biçimde fazla olduğu saptandı (ZAP70 $p=0,000$) (CD38 $p=0,001$). Kemik iliği infiltrasyon paternine göre ZAP70 ve CD38 boyanma dağılımı Tablo 13'te sunulmaktadır.

Tablo 13: Kemik iliği infiltrasyon paternine göre ZAP70 ve CD38 boyanma dağılımı

Kemik iliği infiltr. paterni	ZAP70		CD38		
	negatif	pozitif	negatif	pozitif	toplam
Diffüz	9 (%10,7)	29 (%34,4)	18 (%21,4)	20 (%23,7)	38 (%45,2)
Nodüler	8 (%9,5)	2 (%2,3)	8 (%9,5)	2 (%2,3)	10 (%11,9)
İnterstisyel	18 (%21,4)	11 (%11,3)	27 (%32,1)	2 (%2,3)	29 (%34,5)
Mikst	4 (%4,7)	3 (%3,5)	6 (%7,1)	1 (%1,18)	7 (%8,3)
Toplam	39 %100	45 %100	59 %100	25 %100	84 %100



Şekil 8: Kemik iliği infiltrasyon paternlerine göre ZAP70 ve CD38 pozitiflik oranlarının dağılımı

ZAP70 ve CD38 ekspresyonlarının karşılaştırmasında (Tablo 14), boyanma oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmış olup; boyanma skorları arasında pozitif korelasyon olduğu gözlemlendi ($p=0,000$ $r=0,606$).

Tablo 14: ZAP70 ve CD38 immünohistokimyasal markerların ekspresyon dağılımları

		CD38		
		negatif	pozitif	toplam
ZAP70	negatif	39 (%66,1)	0 (%0,0)	39 (%46,4)
	pozitif	20 (%33,9)	25 (%55,6)	45 (%53,6)
Toplam		59 (%70,2)	25 (%29,8)	84 (%100)

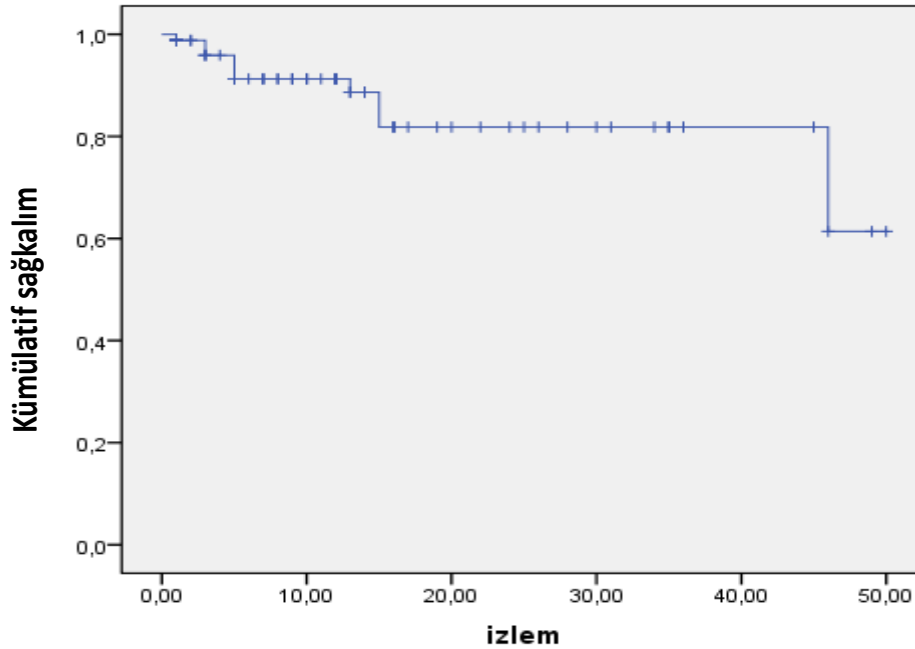
84 hastaya ait parafine gömülü kemik iliği biyopsi örneklerinden yeterli doku bulunan 50 bloktan DNA izolasyonu yapıldı. 50 hastaya ait örneğin 20 tanesinden uygun temizlik ve konsantrasyonda DNA elde edildi. 20 hastaya ait DNA örneklerinden Biomed-2 primerler kullanılarak PCR ve sekans analizi ile IgVH mutasyon durumu değerlendirildi. Bir hastada VH5, dört hastada VH3 ve bir hastada VH6 yeniden düzenlenimi saptandı. Yapılan sekans sonuçları genbank database'ler ile karşılaştırılarak her genin homolojisi değerlendirildi. VH5 (VH5-51) bir vakada kullanıldı ve %96 homoloji saptandı. VH3 (VH3-21) dört hastada kullanıldı sırasıyla %88, %86, %90 ve %91 homoloji saptandı. VH6 (VH6-1) gen kullanımı saptanan bir hastada ise homoloji %92 idi.

IGVH gen mutasyonu saptanan hastaların kemik iliği infiltrasyon paternlerine bakıldığında üç hastada diffüz, iki hastada interstisyel, bir hastada mikst infiltrasyon gözlemlendi. Mutasyon saptanan hastaların Binet klinik evrelerine bakıldığında iki hastanın Evre B, dört hastanın Evre C olduğu, bunun yanı sıra altı hastanın da tanı sonrası kısa bir süre sonra tedavi gereksinimi olduğu izlendi. Üç hastada ZAP70, iki hastada CD38 ekspresyonu bulundu. Mutasyon bulunan bir hastanın takip süresi içerisinde öldüğü saptandı. IgVH mutasyon durumu ile yaş ($p=0,333$), cinsiyet ($p=0,394$), Binet klinik evre ($p=0,413$), tanı sonrası tedavi gereksinimi ($p=0,91$), kemik iliği infiltrasyon paterni ($p=0,120$), ZAP70 ($p=1,000$) ve CD38 ($p=0,831$) arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Altı hastaya ait mutasyon durumu, kemik iliği infiltrasyon paterni ve immünohistokimyasal özellikleri tablo 15'de sunulmaktadır.

Tablo 15: Altı hastaya ait mutasyon durumu, kemik iliği infiltrasyon paterni ve immünohistokimyasal özellikleri

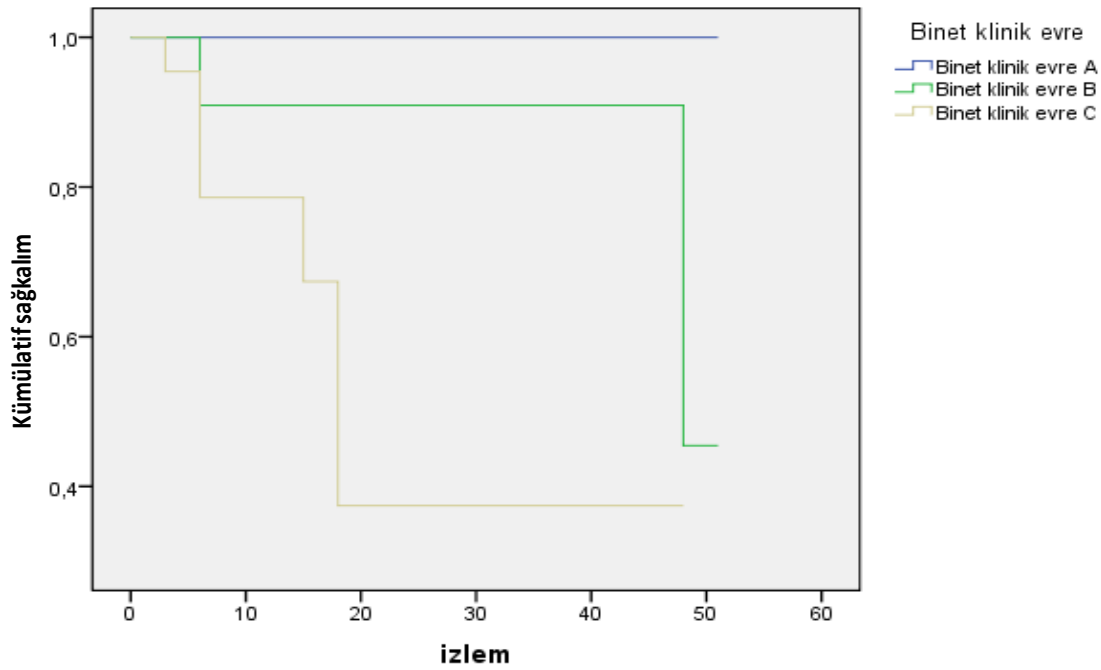
Hasta	ZAP70	CD38	İnfiltrasyon tipi	VH ailesi	Germline karşılığı	Homoloji %
1	-	-	Diffüz	VH3	VH3-21	%88
2	-	-	Mikst	VH5	VH5-51	%96
3	-	-	Diffüz	VH3	VH3-21	%86
4	+	+	Diffüz	VH6	VH6-1	%92
5	+	+	İnterstisyel	VH3	VH3-21	%90
6	+	-	İnterstisyel	VH3	VH3-21	%91

84 olgu üzerinde yapılan sağkalım analizlerinde ortalama sağkalım süresi $13,452 \pm 12,714$ ay olarak saptandı. 84 hastanın 40'ının (%47,6) tanı sonrası tedavi gereksinimi oldu. On hastanın 1-46 ay arasında değişen sürelerde öldüğü görüldü (Şekil 9).



Şekil 9: Olguların kümülatif sağkalım grafiği

Altısı erkek, dördü kadın olan bu hastaların yaşları 45-71 arasında değişmekteydi. Altısı interstisyel, biri nodüler, kalan üçü ise diffüz kemik iliği infiltrasyonu gösteren, yedisi Binet Evre C, üçü Binet Evre B olarak değerlendirilen hastaların tümünün kemoterapi almış olmalarına karşın hastalık dolayısıyla ex olduğu görüldü. Ölen hastaların yedisinde ZAP70, dördünde CD38 pozitifliği saptandı. Bu hastalar için elde edilen ZAP70 ($p=0,471$), CD38 ($p=0,368$) boyanma oranları, kemik iliği infiltrasyon paterni (0,710) ve IgVH mutasyon durumu ($p=0,520$) arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi. Binet klinik evre ile ölüm arasında anlamlı ilişki ($p=0,009$) saptanmış olup, ölen hastaların tamamının ileri evrede oldukları gözlemlendi.



Şekil 10: Olguların Binet klinik evrelerine göre kümülatif sağ kalım grafiği

5. TARTIŞMA

Kronik lenfositik lösemi batı ülkelerinde en sık izlenen lösemi tipi olup, değişken klinik gidişe sahip lenfoid bir malignitedir (10, 21). Erkeklerde iki kat daha fazla görülen bu tümörün ortalama ortaya çıkış yaşı 65'tir (30). Çalışmamızda değerlendirilen 84 olgunun yaş (ortalama 65.36 ± 12.5) ve cinsiyet (%65 erkek, %35 kadın) dağılımları literatürle uyumludur. KLL'li hastaların %20'si tanı anında 55 yaşının altındadır ve son yıllarda genç hastaların oranı artmaktadır (15,17,69). Çalışmamızda 25 hasta tanı anında 55 yaşının altında saptanmıştır.

Ortalama yaşam süresinin yaklaşık on yıl olduğu belirtilen bu hastalıkta prognoz bireyden bireye farklılıklar göstermektedir (207). Tüm KLL olgularının yaklaşık 1/3'ü yaşamları boyunca tedavi gerektirmez, diğer 1/3'ü yavaş klinik gidişten sonra ilerleme gösterir. Kalan 1/3 hasta tanı anında veya tanıdan kısa bir süre sonra tedavi gerektirir (208). Bugün için KLL'de kullanılan, Rai ve Binet klinik evreleme sistemleri olarak adlandırılan iki farklı evreleme sistemi mevcuttur (103, 209). NCI-WG ölçütlerine göre Rai Evre 3 / 4 ve Binet Evre C hastalarda erken tedavi endikasyonu varken; Rai Evre 1 / 2 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 (64). Her iki sistemde de evre ile sağkalım süresi arasında anlamlı bir ilişki mevcuttur. Buna rağmen her iki evreleme sisteminin de bazı eksik tarafları vardır. Herhangi bir evrede bulunan hastalar arasında hastalığı progresif olabilecek hastaların yavaş seyirli olanlardan ayrımında yararlı olmazlar. Çalışmamızda Binet klinik evreleme sistemine göre; 32 hasta (%38,1) Evre A, 28 hasta (%33,3) Evre B, 24 hasta (%28,6) Evre C olarak değerlendirilmiştir. Binet klinik evre ile sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmış olup; ölen hastaların tamamının ileri evrede oldukları gözlenmiştir. Yine çalışmamızın sonuçlarına göre, klinik evre ile tanı sonrası tedavi gereksinimi arasında anlamlı farklılık olduğu ve ileri evre hastaların daha erken tedaviye ihtiyaç duydukları saptanmıştır. Evreleme sistemleri yanında KLL'de prognozu belirlemeye yönelik pek çok çalışma vardır (210). Rai ve Binet evreleme sistemleri yanısıra lenfosit katlanma zamanı, serum $\beta 2$ mikroglobulin düzeyi, çözünür CD23, serum timidin kinaz, kemik iliği infiltrasyon paterni ve sitogenetik anomaliler gibi parametreler prognostik faktörler olarak kullanılmaktadır. Ancak bu parametreler özellikle erken evredeki KLL olgularında, stabil veya progresif formları ayırmakta yetersiz kalmaktadır (211).

Kemik iliği biyopsi incelemesi KLL tanısı için genellikle esansiyel olmamasına rağmen, klinik gidiş ve tedaviye cevabın değerlendirilmesinde oldukça yararlıdır. İlave olarak atipik morfoloji gösteren KLL tanısını destekler ve infiltrasyon tipi hakkında bilgi sağlar (207). KLL'de kemik iliği biyopsi örneğinde lenfoid infiltrasyon paterninin prognostik faktör olabileceği bildirilmektedir. Diffüz infiltrasyon paternini kötü prognoz, diffüz olmayan (interstisyel ya da

nodüler) infiltrasyon paternini ise iyi prognozla ilişkilendiren çalışmalar bulunmaktadır (25,131). Çalışmamızda olguların % 45,2'sinde diffüz, %34,5'inde interstisyel, %11,9'unda nodüler ve %8,3'ünde mikst infiltrasyon gözlenmiştir. Yaptığımız çalışmada ZAP70 ve CD38 ekspresyonunun diffüz infiltrasyon gösteren olgularda diğer olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde fazla olduğu saptanmıştır. Kemik iliğinde diffüz infiltrasyon gösteren hastaların tanı sonrası erken tedavi gereksinimi olduğu ve Binet klinik evre açısından ileri evre hastalar olduğu bulunmuştur. Schade ve arkadaşları 35 olguluk çalışmalarında kemik iliğinde diffüz infiltrasyon gösteren lösemi hücrelerinde güçlü ZAP70 boyanması saptamışlar, nodüler tutulum gözlenen olguların ZAP70 negatif olduğunu gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmada diffüz tutulumlu olgularda IgVH mutasyonu bulunmadığı, non-diffüz tutulumlarda ise IgVH mutasyonu izlendiği saptanmıştır (69). Kemik iliği infiltrasyon paterni histomorfoloji ve infiltrasyon tipinin kombine değerlendirilmesinde yararlıdır. Sadece kemik iliği infiltrasyon tipi prognostik bir marker olarak değerlendirildiğinde; iyi klinik seyirli bazı KLL olguları kötü risk grubu içerisinde klasifiye edilebilir. Bu nedenle ZAP ekspresyonu gibi ilave incelemeler yapılarak tedavi gereksinimi olan hasta grupları konfirme edilebilir (211).

Kronik lenfositik lösemi'de belirsizliğe çözüm getirmek için hastalığın davranışını erken evrede gösteren biyolojik işaret arayışları hız kazanmış ve son yıllarda prognostik öneme sahip çok sayıda biyolojik işaret saptanmıştır. IgVH mutasyon durumu hastalığın patogeneze ışık tutması ve prognozu belirlemedeki önemi nedeniyle daha farklı konumlandırmayı gerektirir (208). IgVH mutasyonunun varlığı veya yokluğu KLL'nin iki alt grubunu belirlemede kullanılabilecek en güvenilir prognostik faktördür (25). Genel olarak M-KLL olguları yavaş gidişlidir, tedavisiz ve hafif tedavilerle ortalama sağkalımları 25 yıldır. U-KLL olguları hızlı gidiş gösterirler ve ortalama sağkalımları yaklaşık 8 yıldır (15, 17). KLL'de kullanılan IgVH repertuarı normal B hücrelerinden farklıdır. IgVH4-34, IgVH3-7, IgVH1-69, IgVH3-21 gibi IgVH bölgeleri normalden sık kullanılmaktadır. M-KLL olgularında IgVH4-34, IgVH3-7, IgVH3-23 sık kullanılırken, U-KLL olgularında IgVH1-69'un kullanımı siktir (208). M-KLL olgularında VH3-21 geni kullananlar genel tanımlamanın dışında kalırlar ve mutasyon durumundan bağımsız olarak sağkalımları kısadır (192). Son yapılan çalışmalarda cut-off değeri %98 alındığında progresif olan hasta grubunun mutasyonsuz olduğu, sağkalım ve tanı sonrası tedavi süresinin dikkate değer ölçüde kısa olduğu saptanmıştır (212,213, 214). Çalışmamızda mutasyon bulunan olgularda VH5-51, VH3-21 ve VH6-1 gen kullanımları saptanmış olup, VH3-21 gen kullanımı daha sık olarak gözlenmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda M-KLL olgularının yavaş klinik gidişli ve iyi prognozlu bulunmasının aksine, çalışmamızda mutasyon saptanan olguların Binet klinik Evre B, C olmaları ve tanı sonrası erken tedavi gereksinimi duymaları, kısa sağkalım ile ilişkilendirilen VH3-21 gen mutasyonunun daha fazla oranda bulunmasına bağlı olabilir. Bu yeni prognostik markerin hastalığın seyri ve

progresyon açısından riskini belirlemede yararlı olduğunu göstermek için daha geniş vaka grupları ile çalışmaya ihtiyaç vardır.

Mutasyonlu ve mutasyonsuz KLL subtipleri arasında yüksek dereceli anlamlı farklılıkların görülmesi, son birkaç yılda KLL’de VH/VL gen kullanımı ve mutasyon durumu üzerinde daha geniş araştırmaları beraberinde getirmiştir. Bu çalışmalar KLL’de bazı IgVH gen aile üyelerinin daha eğilimli olarak kullanıldığını ve belli bazı IgVH gen aile üyelerinde daha yüksek mutasyon oranı saptandığını göstermiştir (215). Bu bulgular tanımlanamayan yabancı ya da kendi antijenlerine karşı lösemik B hücrelerin klonal genişleme ve ayrımını ifade etmektedir. Bu anlamda çevresel ve etnik varyasyonlar KLL’de IgVH gen kullanımını etkileyebilir (213). Önceki çalışmaların çoğu benzer coğrafik ve etnik özellikler gösteren batı toplumunda yapılmış olup, en sık görülen VH3-21 kullanımı İskandinavya bölgelerinde (%11,7), İrlanda’da (%7,9) ve Akdeniz ülkelerinde (%2-3) saptanmıştır. Literatürde Asya ülkelerindeki KLL hastaları konusunda çok az bilgi mevcuttur. Son zamanlarda Japonya (216), Çin(212) ve İran’da(213) küçük hasta grupları üzerinde yapılan birkaç çalışma vardır. Bunun sebebi KLL’nin insidansının Asya popülasyonunda Batı ülkelerine göre daha az sıklıkta görülmesi olabilir. Chen ve ark.’nın 65 Çinli KLL hastası üzerinde yaptıkları çalışmada Batıda KLL hastalarında sıklıkla saptanan VH1-69 ve VH3-21 gen kullanımından farklı olarak, VH4-34, VH4-59, VH3-23, VH4-61 ve VH3-11 gen kullanımını daha sıklıkla gözlemlemişlerdir (212). Farsangi ve ark.’nın 87 İranlı KLL hastası üzerinde yaptıkları çalışmada ise VH3-7, VH3-30, VH3-48, VH4-39 ve VH1-8 gen kullanımının daha sık olduğu gösterilmiştir. Farklı etnik popülasyondan olan KLL hastalarında IgVH gen kullanımındaki çarpıklık, KLL hastalığının gelişiminde henüz tanımlanmayan patojen ya da otoantijenlerin rolü olduğunu düşündürmektedir (213).

IgVH mutasyon analizi klinik çalışmalarda hastaları gruplamak için kullanılan kuvvetli ve bağımsız bir prognostik belirteçtir (208). Bununla beraber IgVH mutasyonunun analizi, karmaşık, pahalı ve çalışma süresi uzundur (10, 15). Bu nedenle rutin tanısal laboratuvar testi olarak kullanılması henüz uygun değildir (131). IgVH mutasyon analizinin nasıl yapılacağı ve değerlendirileceği konusunda standartlar belirlenmesi ihtilafları önleyecek ve farklı serilerin kıyaslanmasını kolaylaştıracaktır (208). IgVH mutasyon durumu, kötü klinik gidişli hastalarda erken tedavi açısından yararları olabilir, fakat bu konuda kontrollü klinik çalışmalara ihtiyaç vardır (1).

IgVH mutasyon analizi için kılavuzlar oluşturulmasına karşın işlemin yoğun laboratuvar çalışması gerektirmesi klinik çalışmalar dışında kullanılmasının önündeki büyük engeldir (208). Yapılan bazı çalışmalarda IgVH mutasyon durumu ve prognoz arasındaki korelasyonun kesin olmadığı da ileri sürülmektedir (192). Ayrıca IgVH mutasyon analizinin rutin laboratuvar

kullanımının oldukça zor ve pahalı olması, mutasyonun olup olmadığını gösterebilecek yeni faktörler bulma gereksinimini doğurmuştur (10, 13). Geline nokta ZAP70 ve CD38 adaylar arasında öne çıkanlardır (208).

CD38 prognostik bir belirteç olmasının yanı sıra KLL patogenezi ağının önemli bir parçasıdır. KLL B lenfositlerinde CD38'e CD31 ligandının bağlanması, hücrede çoğalma ve sağkalım sinyallerini güçlendirir (208). KLL'de CD38'in patobiyolojik rolü ve ekspresyonu pek çok çalışmada konu edilmiştir. KLL'de yüksek CD38 ekspresyonu, kötü klinik gidiş ile ilişkili bulunmuştur (217). IgVH mutasyon durumu ve CD38 ilişkisini irdeleyen ilk yayınlarda CD38'in IgVH mutasyon durumunu %92 doğrulukla gösterebildiği öne sürülmüştür (208). Zupo ve ark. KLL hastalarının lenfositlerdeki CD38 ekspresyonu temelinde alt gruplara ayrılabilirliğini rapor etmişlerdir (218). Damle ve arkadaşları çalışmalarında yüksek CD38 ekspresyonu gösteren KLL olgularında IgVH mutasyonu bulunmadığını, düşük düzeylerde CD38 ekspresyonu gösterenlerde ise IgVH mutasyonu ve iyi prognoz arasında korelasyon bulunduğunu saptamışlar ve CD38'in KLL'de IgVH mutasyon durumu yerine kullanılabilecek bir belirleyici olabileceğini öngörmüşlerdir (17). CD38'in bu prognostik değeri diğer yazarlar tarafından da desteklenmiştir (211). Ayrıca, Chevallier ve ark. lösemik hücrelerdeki CD38 ekspresyonunun hastalık sürecinde değişkenlik gösterebileceğini öne sürmüştür (219). İbrahim ve ark.'nın 218 olgulu çalışmada flowsitometrik olarak %20 veya daha çok malign hücrede CD38 ekspresyonu gözlenen olgularda prognozun kötü ve %20'den daha az hücrede CD38 ekspresyonu izlenen olgularda ise prognozun iyi olduğu bulunmuştur. Buna dayanarak KLL olgularının prognostik olarak iki farklı alt gruba bölünebileceği öngörülmüştür (22). Morabito ve ark. ise, %30 üzerinde CD38 ekspresyonu gözlenen olguların, U-KLL ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (220). Khoudoleeva ve ark.'nın yaptığı 202 olguyu içeren çalışmada %30 ve üzeri ekspresyon gösteren olgular pozitif kabul edilmiş, farklı doku tiplerinde CD38 ekspresyonu karşılaştırıldığında lenf nodu ve dalakta, kemik iliği ve periferik kana göre daha yüksek ekspresyon saptanmıştır (217). CD38 ekspresyon pozitifliğinin KLL'deki diğer negatif prognostik belirleyiciler ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Bunlar, ZAP70, sitogenetik anomaliler, serum CD23, serum β 2 mikroglobulin, p53 fonksiyonu ve hücre boyutudur (132). Domingo-Domenech ve ark. CD38 pozitifliği gösteren hastaların, CD38 negatif hastalara göre daha sık tedavi gereksinimi olduğunu saptamışlardır (221). Ayrıca Ottagio ve arkadaşları CD38 ekspresyonu ile kompleks sitogenetik anormallikler arasında korelasyon bulunduğunu bildirmişlerdir (222). Çalışmamızda %30 ve üzeri CD38 pozitifliği ile yaş, cinsiyet, Binet klinik evre ve IgVH mutasyon durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. CD38 pozitif hastaların çoğunluğunun tanı sonrası erken tedavi gereksinimi olduğu saptanmış; fakat istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamış olup; CD38 pozitifliği ile ZAP70 arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir.

Son zamanlarda ZAP70'in IgVH mutasyon durumu yerine kullanılabileceği, agresif klinik gidiş gösterecek hastaları belirlemede yardımcı olabileceği üzerinde durulmaktadır (14). Normalde B lenfositlerde eksprese edilmeyen bu belirleyici, KLL hücrelerinde saptanmıştır. ZAP70 yalnızca IgVH mutasyon durumu belirleyicisi olarak değil, aynı zamanda prognostik faktör olarak da yardımcıdır. Hastalık süresince ekspresyonunun stabil olduğu bildirilmiştir (5, 214). Yapılan çalışmalarda ZAP70 ile IgVH mutasyon durumu arasında %90'dan fazla uyum saptanmış ve prognozu belirlemede en IgVH mutasyon analizi kadar değerli olduğu kanıtlanmıştır (208). Rassenti ve ark.'nın yaptığı 1000 vakalık çalışmayla, ZAP70'in ilk tedaviye kadar geçen zamanı saptamak için en güçlü risk faktörü olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmaya göre, IgVH mutasyon durumu ve CD38'in sadece ZAP70'in negatif olduğu hastalarda risk değerlendirmesinde katkı sağladığı gösterilmiştir (21). ZAP70'in KLL B hücrelerinde yüzey Ig reseptörünün etkin sinyal ilemesine katkı sağlayarak agresif hastalık gelişiminde rol oynadığı sanılmaktadır (197). ZAP70 pozitif KLL hastaları, ZAP70 negatif KLL hastaları ile karşılaştırıldığında daha saldırgan bir klinik ile karakterizedir (16). Çeşitli çalışmalarda iki grup arasında ilerlemesiz sağkalım açısından anlamlı fark ortaya konulmuştur (16,21). ZAP70 pozitif olan hastaların toplam sağkalımının ZAP70 negatif hastalara göre daha kısa olduğu gösterilmiştir (16, 21, 129). Crespo ve ark.'nın çalışmasında ise, erken evre hastalarda ZAP70 negatif grupta sağkalım avantajı gösterilmiş fakat tüm hastalar analiz edildiğinde ZAP70 ifadenmesiyle sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (20). Karşıt olarak Weinberg ve ark.'nın çalışmasında, ZAP70 pozitif hastalarda kısa sağkalım gözlenmiş fakat fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (133). Bizim çalışmamızda da ölen hastaların çoğunluğunda ZAP70 pozitifliği gözlenmiş; ancak istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır.

ZAP70 ekspresyonu kemik iliği biyopsi örneklerinde immünohistokimyasal yöntemle, periferik kan örneklerinde PCR veya flow sitometrik olarak ölçülebilir. Flow sitometrik ölçüm bu yöntemler arasında klinikte kullanımı en kolay olanıdır. Eşik değer olarak %20 düzeyi genel kabul görmektedir (208). KLL'de doku kesitleri kullanılarak immünohistokimya ile ZAP70 ekspresyonunun saptanması kolay ve ucuz bir tekniktir. Ancak bu tekniğin eleştiri alan tarafları kantitatif olmaması ve değerlendirilmesindeki subjektifliktir. Bu nedenle yapılan bazı çalışmalarda immünohistokimya ve RT-PCR ile ZAP70 mRNA düzeyleri karşılaştırılmış, immünohistokimyanın ZAP ekspresyonunu göstermedeki spesifikliği değerlendirilmiştir (214). Schade ve ark.'nın yaptıkları çalışmada immünohistokimyasal ZAP70 ekspresyonu ile kantitatif RT-PCR mRNA düzeylerini karşılaştırmışlar ve immünohistokimya ile mRNA ölçümleri arasında pozitif korelasyon saptamışlardır (69). İmmünohistokimyanın avantajı parafine gömülü dokulara uygulanabilir olması ve taze doku ihtiyacını ortadan kaldırmasıdır. Klinik çalışmalarda retrospektif analiz açısından oldukça

yardımcıdır (214). Korac ve arkadaşlarının 62 KLL hastası üzerinde yaptıkları çalışmada immünohistokimyasal olarak saptanan ZAP70 pozitifliği ile cinsiyet, Binet klinik evre, kemik iliği infiltrasyon tipi ve p53 delesyonu arasında anlamlı farklılık saptanmış olup; KLL hücrelerinde ZAP70 'in saptanmasında immünohistokimyanın kolay ve rutin olarak uygulanabilecek bir teknik olduğunu desteklemişlerdir (223). İmmünohistokimyasal veya flow sitometrik olarak, %20 veya daha fazla lösemik hücrede ZAP70 pozitifliği gösteren olguların U-KLL ile ilişkili olduğu, M-KLL olgularında ise %20'den az lösemi hücresinde ZAP70 ekspresyonu saptanan çalışmalar bulunmaktadır (5). Orchard ve ark. ZAP70 ekspresyonunun eşik değeri olarak % 10'u belirlemişlerdir (14). Rassenti ve ark. yaptığı çalışmada ZAP70 ekspresyonunun eşik değeri olarak %10 ya da %30 alındığında tedavisiz izlem süresi açısından fark bulamamışlardır. Eşik değeri olarak %20 alındığında önemli ilişki saptanmıştır (21). Wiestner ve ark. Western blot, RT-PCR ve immünohistokimyasal olarak saptanan ZAP70 ekspresyon düzeylerinin IgVH mutasyon durumunun çok iyi bir belirleyicisi olduğunu göstermişlerdir (19). Çalışmamızda immünohistokimyasal yöntemle uygulanan ZAP70 boyasında, %25 ve üstü boyanmaların pozitif kabul edildiği hastaların Binet klinik evreleme sistemine göre ileri evre hastalar olduğu gözlenmiş, fakat aralarında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

ZAP70 pozitif hastaların çoğunluğunun tanı anında tedavi gereksinimi olduğu ileri sürülmektedir. Weinberg ve ark.'nın yaptığı çalışmada ZAP70 ile tedavisiz izlem süresi arasında ilişki gözlenmemiştir (133). Rassenti ve ark.'nın 307 KLL hastasıyla yaptığı çalışmada, ZAP70 negatif olan grupta, ortalama tedavisiz izlem süresi 9,2 yıl, ZAP70 pozitif grupta, ortalama tedavisiz izlem süresi 2,9 yıl saptanmıştır. Bu çalışmada ZAP70 ekspresyonu, tedavi gereksiniminin önemli bir belirleyicisi olarak bildirilmiştir (21). Durig ve arkadaşları ZAP70 pozitif hastaların, negatiflere göre yoğun kemoterapi gereksinimi olduklarını bildirmişlerdir (16). Hus ve arkadaşları 156 olguluk serilerinde, tedavinin gerekli görüldüğü hastalarda, tedavi görmeyenlerden daha fazla ZAP70 ekspresyonunun olduğunu tespit etmişlerdir (5). Diğer serilere göre oldukça yüksek olmakla birlikte, Orchard ve arkadaşları ZAP70 pozitif KLL hastalarında ortalama yaşam süresinin 9.3 yıl, negatif hastalarda ise 24.4 yıl olduğunu bildirmişlerdir (14). Admirand ve ark. 63 vakalık çalışmalarında ZAP70 pozitifliğinin tanı sonrası tedavi gereksinimi (< 6 hafta) ve progresyonun artmış riski ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Buna karşın IgVH mutasyonunun yokluğu ile tanı sonrası tedavi gereksinimi ve progresyon arasında zayıf ilişki saptamışlardır (214). Diğer çalışmalar da ZAP70 pozitif hastalarda tedavisiz izlem süresinin daha kısa olduğunu desteklemektedir (16,129). Çalışmamızda tanı sonrası tedavi gereksinimi ile ZAP70 pozitifliği arasında anlamlı farklılık saptanmış olup, ZAP70 boyanması gösteren olguların tanı sonrasında daha erken tedavi gereksinimi olduğu gözlenmiştir.

ZAP70 aşırı ekspresyonu bağımsız negatif prognostik faktör olup, CD38 ekspresyonu ve IgVH mutasyon yokluğu ile koreledir (220). CD38 ve ZAP70 ekspresyonunu değerlendirmek, IgVH mutasyon durumunu belirlemekten daha ucuz ve zaman kazandırıcı bir yöntemdir. ZAP70 ve CD38'in kombine analizi daha rafine prognostik bilgi sağlamaktadır ve hastaları iyi, orta ve kötü prognoz olarak üç alt gruba ayırmaya izin vermektedir (224). ZAP70 ve CD38'in beraber analizinin her ikisinin tek başına olan analizinden daha önemli bilgiler verdiğine dair raporlar yayınlanmaktadır (5,16). Morilla ve ark.'nın yaptığı çalışmada IgVH mutasyon durumunu göstermede ZAP70 ve CD38 ekspresyonunun birlikte kullanımının tek başına kullanımına göre daha fazla yarar sağladığı öngörülmüştür. ZAP70 ve CD38'in ayrı olarak ekspresyonları daha aktif bir fenotip ile ilişkili olabilir (224). KLL'de flow sitometrik ZAP70 ve CD38 kombine analizinin yapıldığı bir çalışmada, uniform negatif (CD38 negatif, ZAP-70 negatif) sonuç veren hastalarda iyi prognoz, uniform pozitif (CD38 pozitif, ZAP-70 pozitif) sonuç veren hastalarda kötü prognoz, uyumsuz (CD38 pozitif, ZAP-70 negatif veya CD38 negatif, ZAP-70 pozitif) sonuç veren hastalarda da intermediate prognoz sergilendiği bildirilmektedir (225). Schroers ve ark. 252 KLL hastası ile yaptıkları çalışmada ZAP70 ve CD38'in (>% 30) birlikte pozitifliğinde klinik gidişin kötü olduğunu göstermişlerdir (226). Del Giudice ve ark. CD38 ve ZAP70'in her ikisinin erken evre KLL hastalarında tedavisiz izlem süresinin önemli bir belirleyicisi olduğunu rapor etmişlerdir. ZAP70 ve CD38'in beraber analiziyle hastaları iyi, orta ve kötü prognozlu olmak üzere 3 gruba ayırmışlardır. Bu çalışmada, ZAP70 ve CD38'in her ikisinin de pozitif olduğu grupta klinik gidiş kötü, ZAP70 pozitif / CD38 negatif ve ZAP70 negatif / CD38 pozitif gruplarda prognoz orta, her ikisinin de negatif olduğu grupta klinik gidiş iyidir (227). Önceki çalışmalarda ZAP70 ve CD38'in her ikisinin pozitif olduğu hastalarda ortanca tedavisiz izlem süresi, her ikisinin negatif olduğu hastalardan kısa bulunmuştur (226,227). D'Arena ve arkadaşları 157 olguluk flow sitometrik çalışmalarında her iki belirleyicinin de kötü klinik ve biyolojik özellikler ile korele olduklarını, ZAP70 ve CD38 pozitif olguların, negatif olgulara göre daha kısa tedavisiz dönem geçirdiklerini ve hızlı ilerlediklerini öne sürmüşler, ayrıca ZAP70'in CD38 ve mutasyon durumundan daha güçlü bir belirleyici olduğunu ve kötü klinik gidişi belirlemede bu iki belirleyicinin kombinasyonunun, yalnız ZAP70 veya CD38'den daha kullanışlı olduğu yönünde görüş bildirmişlerdir (225). Son zamanlarda Khoudoleeva ve ark. yaptığı çalışmada KLL'li hastaların kan, kemik iliği, lenf nodu ve dalak örneklerinde ZAP70 ve CD38 ekspresyonu birlikte değerlendirilmiş, kan ve kemik iliği örneklerinde ZAP70 ve CD38 ekspresyonu arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (217). Rivkina ve ark. yaptığı 120 vakalık çalışmada ZAP70 ve CD38 ekspresyonlarının klinik evre ile ilişkisi araştırılmış, ve aralarında pozitif korelasyon saptanmıştır. Bu çalışmaya göre ZAP70 ve CD38'in birlikte değerlendirilmesi hastalığın olası evresi hakkında bilgi verebilmektedir (228).

Çalışmamızda da bu iki belirleyici bir arada kullanılmış ve ZAP70 ekspresyonu ile CD38 ekspresyonu arasında anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır.

Yapılan çalışmalarda ZAP70 ve IgVH mutasyonu ya da CD38 ve IgVH mutasyonu arasındaki ilişki incelenmiş, çok az çalışmada bu üç faktör kombine olarak kullanılmıştır. Morilla ve ark.'nın yaptığı çalışmada bu üç değişkenin simültane analizi ile tanı sonrası tedavisiz interval hakkında daha fark gözetici sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir (224).

KLL tanısını yeni alan hastalarda tedavi kararı evreleme ve hastalık aktivitesini içeren standart klinik parametrelere dayanmaktadır. Bununla beraber bu yeni prognostik markerlar hastalığın seyri ve progresyon açısından görece riski belirlemede yararlı olabilmektedir. Bu kriterler bugüne dek uygulanmakla birlikte ortaya atılan yeni prognoz parametreleri doğrultusunda değiştirilmeleri muhtemeldir. Gelecekte bu markerlar tanı sonrası hastalığın yönetiminde, özellikle progresyonu düşük hastalarda kontrollerin sıklığını belirlemede yardımcı yöntemler olarak kullanılabilir. Bu monitorizasyon özel klinik durumlardan ziyade genel olarak uygulanır hale getirilebilir. Tüm bunlar için, bu yeni parametrelere dayanarak erken progresyon açısından riskli bulunan hastalarda, klinik olarak hastalık progresyonundan önce erken tedavi verilmesinin faydasını değerlendiren klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Son çalışmalarda elde edilen bulguların daha sağlıklı prognostik skor elde etmeyi amaçlayan prospektif çalışmalar ve kontrollü klinik denemeler ile geçerliliğinin denetlenmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1-Çalışmaya alınan 84 olgu 35-89 yaş aralığında idi (ort. $65.36 \pm 12,5$). Olguların 29'u (%35) kadın, 55'i (%65) erkekti. Çalışmamızda değerlendirilen 84 olgunun yaş ve cinsiyetleri literatürle uyumludur.

2-Çalışmamızda Binet klinik evreleme sistemine göre; 32 hasta (%38,1) Evre A, 28 hasta (%33,3) Evre B, 24 hasta (%28,6) Evre C olarak değerlendirilmiştir.

3-Kemik iliği infiltrasyon paterni açısından olguların 38'inde (% 45,2) diffüz, 29'unda (%34,5) interstisyel, 10'unda (%11,9) nodüler ve 7'sinde (%8,3) mikst tutulum gözlenmiştir.

4-İmmünohistokimyasal yöntemle uygulanan ZAP70 boyasında %25 ve üstü boyanmalar pozitif kabul edildiğinde; 45 olguda (%53,6) pozitif, 39 olguda (%46,4) negatif boyanma tespit edilmiştir.

5-İmmünohistokimyasal yöntemle uygulanan CD38 boyasında %30 ve üstü boyanmalar pozitif kabul edildiğinde 25 olguda (%29,8) pozitif, 59 olguda (%70,2) negatif boyanma tespit edilmiştir.

6-20 hastaya ait DNA örneklerinden IgVH mutasyon durumu çalışıldı. Bir olguda VH5, dört olguda VH3 ve bir olguda VH6 yeniden düzenlenimi saptandı. Sekans sonuçlarına göre; VH5 (VH5-51) bir olguda kullanıldı ve %96 homoloji saptandı. VH3 (VH3-21) dört olguda kullanıldı sırasıyla %88, %86, %90 ve %91 homoloji saptandı. VH6 (VH6-1) gen kullanımı saptanan bir olguda ise homoloji %92'dir.

7-Tüm olgular için yapılan sağkalım analizlerinde ortalama sağkalım süresi $13,452 \pm 12,714$ ay olarak saptandı. 84 hastanın 40'ının (%47,6) tanı sonrası tedavi gereksinimi oldu. On hastanın 1-46 ay arasında değişen sürelerde öldüğü görülmüştür.

8-Binet klinik evre ile yaş ($p=0,285$) ve cinsiyet ($p=0,720$) arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

9-Kemik iliği infiltrasyon paterni ile yaş ($p=0,272$) ve cinsiyet ($p=0,313$) arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

10-ZAP70 pozitifliği ile yaş ($p=0,200$), cinsiyet ($p=0,243$) ve Binet klinik evre ($p=0,068$) arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

11-CD38 pozitifliği ile yaş ($p=0,186$), cinsiyet ($p=0,751$), Binet klinik evre ($p=0,221$) ve tanı sonrası tedavi gereksinimi ($p=0,139$) arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

12-Ölen hastalar için elde edilen ZAP70 ($p=0,471$), CD38 ($p=0,368$) boyanma oranları, kemik iliği infiltrasyon paterni ($p=0,710$) ve IgVH mutasyon durumu ($p=0,520$) ile ölüm arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

13-IgVH mutasyon durumu ile yaş ($p=0,333$), cinsiyet ($p=0,394$), Binet klinik evre ($p=0,413$), tanı sonrası tedavi gereksinimi ($p=0,91$), kemik iliği infiltrasyon pateni ($p=0,120$) arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

14-İmmünohistokimyasal yöntemle uygulanan ZAP70 boyasında %25 ve üstü boyanmaların pozitif kabul edildiği hastaların Binet klinik evreleme sistemine göre ileri evre hastalar olduğu gözlenmekle birlikte, aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0,068$).

15-Ölen hastaların çoğunluğunda ZAP70 pozitifliği gözlenmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır.

16-CD38 pozitif hastaların çoğunluğunun tanı sonrası erken tedavi gereksinimi olduğu gözlenmekle birlikte, istatistiksel olarak anlamlı ilişki ($p=0,139$) bulunmamıştır.

17-Binet klinik evre ile tanı sonrası tedavi gereksinimi arasındaki ilişki karşılaştırıldığında, ileri evre hastaların daha erken tedaviye ihtiyaç duydukları ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p=0,000$). Klinik evreleme sistemleri; erken evrede progresyona gidecek hastaları belirleme konusunda eksik yönleri olsa da, hastalığın gidişini öngörmede kullanılan klasik parametrelerdir.

18-Binet klinik evre ile ölüm arasında anlamlı ilişki ($p=0,009$) saptanmış olup, ölen hastaların tamamının ileri evrede oldukları gözlenmiştir. Bulgularımız klinik evre ile sağkalım arasında anlamlı bir ilişki olduğunu desteklemektedir.

19-ZAP70 ve CD38 ekspresyonlarının karşılaştırılmasında, boyanma oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmış, boyanma skorları arasında pozitif korelasyon olduğu gözlenmiştir ($p=0,000$ $r=0,606$). KLL’de doku kesitleri kullanılarak immünohistokimya ile ZAP70 ve CD38 ekspresyonunun saptanması kolay ve ucuz bir tekniktir. Ancak bu tekniğin eksiklikleri kantitatif olmaması ve değerlendirilmesindeki subjektifliktir. CD38 ve ZAP70 ekspresyonunu değerlendirmek, IgVH mutasyon durumunu belirlemekten daha ucuz ve zaman kazandırıcı bir yöntemdir. ZAP70 ve CD38’in kombine analizi daha rafine prognostik bilgi sağlamaktadır. Bulgularımız KLL’de ZAP70 ve CD38’in prognostik belirleyici olarak rutinde kullanılabileceğini desteklemektedir.

20-Kemik iliği infiltrasyon paterni ile klinik evre ve tanı sonrası tedavi gereksinimi arasındaki ilişki karşılaştırıldığında, anlamlı farklılık saptanmıştır. Kemik iliğinde diffüz infiltrasyon gösteren hastaların tanı sonrası erken tedavi gereksinimi olduğu ($p=0,019$) ve Binet klinik evre açısından ileri evre hastalar (Evre B, C) olduğu ($p=0,000$) gözlenmiştir. Kemik iliği biyopsi incelemesi KLL tanısı için gerekli olmamasına rağmen, klinik gidiş ve tedaviye cevabın değerlendirilmesinde oldukça yararlıdır. Ayrıca atipik morfoloji gösteren KLL vakalarını

saptamada yardımcıdır ve infiltrasyon tipi hakkında bilgi sağlar. Bulgularımız kemik iliğinde diffüz infiltrasyonun hastalık progresyonu açısından önemli bir risk faktörü olduğunu desteklemektedir. KLL hastalarında prognozu belirlemede yardımcı prognostik faktör olarak kullanılabilir.

21-Kemik iliği infiltrasyon paterni ile ZAP70 ve CD38 ekspresyonu arasındaki ilişki incelendiğinde, her iki immünohistokimyasal marker ile ekspresyonun diffüz tutulumda nodüler, interstisyel ve mikst tutulumla göre anlamlı biçimde fazla olduğu saptanmıştır (ZAP70 $p=0,000$) (CD38 $p=0,001$). Bulgularımız KLL’de ZAP70 ve CD38’in prognostik belirleyici olarak rutinde kullanılabileceğini ayrıca kemik iliği tutulum paterninin de dikkate alınmaya devam edilmesinin gerekli olduğunu desteklemektedir.

22-ZAP70 pozitifliği ile tanı sonrası tedavi gereksinimi arasında anlamlı farklılık saptanmıştır. ZAP70 boyanması gösteren olguların tanı sonrasında daha erken tedavi gereksinimi olduğu bulunmuştur ($p=0.046$). KLL hastalarında, hızlı, pratik ve rutin laboratuarlarda uygulanacak yöntemle hastalığın prognozu hakkında bilgi edinmemiz mümkün olacaktır. Özellikle hastaların ileride tedavi gereksinimi olup olmayacağının önceden belirlenmesinde ZAP70 çok değerlidir. Bu nedenle ZAP70 pozitif olan hastaların daha hızlı progresyonu ve erken tedavi gereksinimleri olabileceği düşünülerek bu hastalar daha yakın izlenmelidir.

23-IgVH mutasyon durumu ile ZAP70 ($p=1,000$) ve CD38 ($p=0,831$) arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. Bu durum mutasyon çalışılan vaka sayısının azlığına bağlanabilir. Yapılan diğer çalışmalarda M-KLL olgularının yavaş klinik gidişli ve iyi prognozlu bulunmasının aksine; çalışmamızda mutasyon saptanan olguların ileri klinik evrede olmaları ve tanı sonrası erken tedavi gereksinimi duymaları, kısa sağkalım ile ilişkilendirilen VH3-21 gen mutasyonunun daha fazla oranda bulunmasına bağlı olabilir. IgVH mutasyon analizi klinik çalışmalarda hastaları gruplamak için kullanılan kuvvetli ve bağımsız bir prognostik belirteçtir. Bununla beraber IgVH mutasyonunun analizi, karmaşık, pahalı ve çalışma süresi uzundur. Bu nedenle rutin tanısal laboratuvar testi olarak kullanılması henüz uygun değildir. Ayrıca IgVH mutasyon analizinin nasıl yapılacağı ve değerlendirileceği konusunda standartlar belirlenmesi gerekmektedir. Bu yeni prognostik markerin hastalığın seyri ve progresyon açısından riskini belirlemede yararlı olduğunu göstermek adına daha geniş vaka gruplarına ihtiyaç vardır. Ayrıca retrospektif çalışmalarla elde edilen bulguların daha sağlıklı prognostik skor elde etmeyi amaçlayan prospektif çalışmalar ve kontrollü klinik denemeler ile geçerliliğinin denetlenmesi gerekmektedir.

7. ÖZET

KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİLİ HASTALARIN KEMİK İLİĞİ BİYOPSİ ÖRNEKLERİNDE IgVH MUTASYON DURUMU İLE ZAP-70 VE CD38'İN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK ANALİZİNİN PROGNOSTİK ÖNEMİ

Amaç: Kronik lenfositik lösemi (KLL) batı toplumunda, erişkinlerde en sık görülen lösemi türüdür. KLL'nin klinik seyri oldukça değişkendir. Hastaların bir kısmı sessiz klinik gidişe sahipken, bir kısmı hızlı ilerleyen agresif bir davranış gösterir. KLL'nin klinik seyrinden dolayı hızlı seyredecek hastaları önceden belirlemek önemlidir. Rai ve Binet klinik evreleme sistemleri erken evrede tanı konmuş hastalardan hangilerinin hızlı seyredeceğini saptamada yetersizdir. Bu nedenle KLL'de prognozu belirlemeye yardımcı çeşitli faktörler tanımlanmıştır. Son zamanlarda immunglobulin ağır zincir değişken bölge (IgVH) mutasyonunun önemi üzerinde durulmakta olup, mutasyon yokluğunun hızlı ilerleyen hastalık ve kısa süreli sağkalım ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. IgVH mutasyonu pahalı, tesbiti zor bir inceleme olup, nasıl yapılacağı ve değerlendirileceği konusunda kabul edilmiş standart bir protokol yoktur. Bu nedenle mutasyon durumunu indirekt olarak gösterecek markerların kullanımı gündeme gelmiştir. KLL'li olguların IgVH mutasyonsuz formlarında zeta zincir ilişkili protein70 (ZAP70) yanı sıra CD38 ekspresyonun saptandığı bildirilmektedir. Bu belirleyicilerin IgVH mutasyonunun yerine kullanılabileceği ileri sürülmektedir.

Bu çalışma, KLL'de hızlı progresyon ve agresif gidişe ilişkileri çeşitli çalışmalarla belirlenen ZAP70 ve CD38 proteinleri ile IgVH mutasyon durumu arasındaki ilişkileri değerlendirmek ve bunların ekspresyonunun kemik iliği infiltrasyon paternleri ile bağlantısı olup olmadığını ortaya koymak amacıyla planlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Beş yıllık süre içinde KLL tanısı konan 84 olgunun kemik iliği biopsi örneklerinin parafin bloklarından elde edilen kesitlere avidin-biotin peroksidaz yöntemiyle ZAP70 ve CD38 antikorları uygulanmıştır. Tümör hücrelerinin her iki antikorla boyanma oranları saptanarak birbirleriyle karşılaştırılmış; her bir antikor ise kendi içinde kemik iliği infiltrasyon paternleri açısından değerlendirilmiştir. Ayrıca 20 hastaya ait parafine gömülü kemik iliği biyopsilerinden izole edilen DNA örneklerinden Biomed-2 primerler kullanılarak PCR ve sekans analizi ile IgVH mutasyon durumu değerlendirilmiş, immünohistokimya ile ilişkisi araştırılmıştır.

Bulgular: Kötü prognostik faktör oldukları yaygın olarak kabul edilen ZAP70 ve CD38'in boyanma oranları arasında istatistiksel olarak pozitif korelasyon ($P=0.000$) bulunmuş, bu korelasyon bu iki belirleyici ile IgVH mutasyon durumu arasında saptanmamıştır. (sırasıyla $p=1.000$ ve $p=0.931$). Ayrıca ZAP70 boyanması gösteren olguların istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde tanı sonrasında daha erken tedavi gereksinimi olduğu gözlenmiştir ($p=0.046$).

Kemik iliği infiltrasyon paterni ile ZAP70 ve CD38 ekspresyonun diffüz tutulumda anlamlı biçimde fazla olduğu saptanmıştır (sırasıyla $p=0,000$, $p=0,001$). Ayrıca diffüz infiltrasyon gösteren olguların tanı sonrası erken tedavi gereksinimi olduğu ($p=0,019$) ve Binet klinik evre açısından ileri evrede (Evre B, C) bulunduğu ($p=0,000$) gözlenmiştir.

Sonuç: KLL’de ZAP70 ve CD38 ekspresyonlarının kötü prognostik belirleyici olarak rutinde kullanılabileceği, IgVH mutasyon durumunun hastalığın seyri ve progresyon açısından riskini belirlemede yararlı olduğunu göstermek için daha geniş vaka gruplarına ihtiyaç olduğu ve kemik iliği biyopsi örneklerinde diffüz infiltrasyonunun kötü prognostik faktör olarak dikkate alınmaya devam edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Özellikle ZAP70 pozitif olan hastaların daha hızlı seyredebileceği ve erken tedavi gereksinimleri olabileceği düşünülerek bu hastalar yakın klinik takip altında tutulmalıdır.

Anahtar kelimeler: KLL, kemik iliği biyopsisi, IgVH mutasyonu, ZAP70, CD38, immünohistokimya, PCR

8.SUMMARY

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF THE IGVH MUTATION STATUS AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF ZAP70 AND CD38 IN BONE MARROW BIOPSIES IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

PURPOSE: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a common malignancy among adults in Western countries. It may have a various processes in a range of between subtle and aggressive nature. It is important to predict whether the patients would have the aggressive disease. Rai and Binnet Classification systems are not enough to make this prediction. Thus, a number of complementary factors have been introduced to predict the prognosis of CLL. Recently, efforts focus on the immunoglobulin heavy chain variable domain (IgVH); it is thought that the absence of mutation is associated with aggressive disease and poor survival outcomes. Identification of IgVH mutations are expensive and difficult; moreover, there is no consensus on any standarts about how to perform or evaluate, so indirect methods indicating the mutation status become more important. It is reported that Zeta chain-associated protein 70 and CD38 are expressed in the absence of IgVH mutations in CLL. It is said these indicators may be used instead of IgVH mutation identification.

This study aims to evaluate the relationships between IgVH, ZAP70 and CD38 proteins, which has been shown to be associated with poor prognosis, and to investigate whether their expression is related with the bone marrow infiltration patterns.

MATERIAL&METHOD: Paraffin blocks of bone marrow biopsy specimen of 84 patients with CLL was collected within 5 years, then ZAP70 and CD38 antibodies were performed to the slices from the paraffin blocks via avidin-biotin method. Staining of tumor cells with these two antibodies were compared, each antibody was assessed with respect to marrow infiltration patterns. On the other hand, DNA samples of 20 patients were isolated from the paraffin blocks and PCR was performed using Biomed-2 primers and IgVH mutation status with sequence analysis was evaluated; then results were compared to immunohistochemistry.

RESULTS: Well known poor prognostic factors, ZAP70 and CD38 had positive correlation between their staining ($p=0,000$); but that correlation was not found between this two indicators and IgVH ($p=1.000$ and $p=0.931$, respectively). It is also observed that ZAP70 staining cases required earlier treatment following diagnosis ($p=0,046$).

Bone marrow infiltration pattern and ZAP70 and CD38 expression were analyzed and with immunohistochemistry, both markers were found to have increased expression in diffuse infiltration (for ZAP70; $p=0,000$, for CD38; $p=0,001$). The patients with diffuse infiltration needed

earlier treatment ($p=0,019$) and they had advanced disease according to Binnet classification (Stage B,C) ($p=0,000$).

CONCLUSION: we conclude that ZAP70 and CD38 expressions may be used in routine practice as a negativ prognostic factor in CLL. Larger study groups are required to demonstrate the risk of IgVH mutation status on the nature and the progression of the disease. It is also revealed that we should propose the diffuse infiltration as a poor prognostic factor. Of note, patients with positive ZAP70 staining may have more aggressive disease and earlier treatment should be considered and so they should have closer follow up.

Keywords: CLL, bone marrow biopsy, IgVH mutation, ZAP70, CD38, immunohistochemistry, PCR

9. KAYNAKLAR

1. Ghia P, Ferreri AM, Caligaris-Cappio F. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 64: 234-46.
2. Kay NE, O'Brien SM, Pettitt AR, Stigenbauer S. The role of prognostic factors in assessing 'high risk' subgroups of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007; 21: 1885-1891.
3. Durak B, Akay OM, Aslan V, Ozdemir M, Sahin F, Artan S. Prognostic impact of chromosome alterations detected by FISH in Turkish patients with B cell chronic lymphocytic leukemia. *Can Gen Cytogen* 2009; 188: 65-69.
4. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2008; 371: 1017-29.
5. 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* 2006; 17: 683-90.
6. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004; 163-83.
7. Ulrika Schade MD, Oliver Bock MD, Sylke Vornhusen. 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~associated protein (ZAP-70). *Human Pathol* 2006; 37: 1153–61.
8. Moreno C, Montserrat E. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev* 2008; 22: 211-19.
9. Gribben JG. Molecular profiling in CLL. In: Gewirtz AM, Muchmore EA, Burns LJ (eds). *American Society of Hematology Education Book*. Washington, 2008: 444-49.
10. Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: intergrating molecular biologic insights into clinical practice for patient with CLL. *Blood* 2004; 103:1202-10.
11. Zenz T, Mertens D, Döhner H, Stilgenbauer S. Molecular diagnostics in chronic lymphocytic leukemia-pathogenetic and clinical implications. *Leuk Lymphoma* 2008; 49: 864-73.
12. Van Bockstaele F, Verhasselt B, Philippe J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev* 2009; 23: 25-47.
13. 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* 2003; 37: 417-20.

14. Orchard JO, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, Hamblin TJ, Stautt LM, Oscier DG. ZAP70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *The Lancet*. 2004; 10: 105-11.
15. Hamblin TJ, Davis Z, Garnier A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1840-47.
16. Düring J, Nückel H, Cremer M, Führer A, Halfmeyer K, Fandrey J, Möröy T, Hitpass- Klein L and Dührsen U. ZAP70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2003; 17: 2426-34.
17. 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. IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in Chronic Lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1840-47.
18. 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* 2003; 102: 2146-55.
19. 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* 2003; 101: 4944-51.
20. Crespo M, Bosch F, Villamor N. ZAP70 expression as a surrogate for immunoglobulin variable region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348: 1764-65.
21. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL. ZAP70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2004; 351: 893-901.
22. Ibrahim S, Keating M, Do KA. CD 38 expression as an important prognostic factor in B-cell Chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 95: 2455-2457.
23. 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 USA* 1991; 88: 9166-70.
24. Latour S, Veillette A. Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling *Curr Opin Immunol*. 2001; 13: 299-306.

25. 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* 2002; 100: 4609-23.
26. Korac P, Ajdukovic R, Kardum Paro M, Jaksic B, Dominis M. Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia. *J Mol Hist* 2009; 40: 81-86.
27. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell Chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001; 194: 1639-1647.
28. Harris NL, Ferry JA. Classification of Non Hodgkin's Lymphomas Neoplastic Hematopathology Ed DM Knowles 2nd ed, Lipincott, William&Wilkins 2001; 691-753.
29. Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization Classification of tumors pathology & Genetics Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC Press Lyon 2001; 121-26.
30. Müller-Hermelink Hk, Montserrat E, Catovsky D, Harris NL. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma.:Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW(eds): World Health Organization Classification of tumours. Pathology & Genetics Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC Press, Lyon 2001; 127-37.
31. Abbas AK, Lichtman AH. Temel İmmunoloji, İmmun Sistem Fonksiyonları ve Bozuklukları. 1. baskı. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık Ltd. Şti, 2007: 95-97
32. Ollila J, Vihinen M. B cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 518-23.
33. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. In: American Society of Hematology 50th Anniversary Reviews. Washington: 2008; 213-23.
34. Venugopal P, Gregory SA. Lymphoproliferative disorders. In: Kahn MJ, Gregory SA (eds). American Society of Hematology Self-Assessment Program. 3rd edition. Washington: 2007; 265-97.
35. Ghia P. IGHV gene mutational status and prognosis in chronic lymphocytic leukemia: its relationship to other prognostic markers. In: Ghia P, Rosenquist R, Davi F (eds). Immunoglobulin Gene Analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia. Milan: Wolters Kluwer, 2009; 81-94.
36. Tobin G. The immunoglobulin genes: structure and specificity in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2007; 48: 1081-86.
37. Chappel CP, Jacob J. Germinal center-derived B cell memory. *Adv Exp Med Biol* 2007; 590: 139-48.

38. Dores GM, Anderson WF, Curtis RE, Landgren O, Ostroumova E. Chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br J Haematol* 2007; 139: 809-19.
39. Ben Ezra J. Small Lymphocytic Lymphoma. In: Knowless DM ed. *Neoplastic Hematopathology*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins, 2001; 773-87.
40. Hsi ED. B-Cell Leukemias of Mature Lymphocytes. In: Hsi ED ed. *Hematopathology*. Philadelphia: Elsevier, 2007; 367-75.
41. Foucar MK. B-Cell choric lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia. *Neoplastic Hematopathology* Ed DM Knowles 2nd ed, Lippincott, Williams&Wilkins, USA. 2001; 1505-28.
42. Pangalis GA, Vassilakopoulos TP, Dimopoulou MN. B-chronic lymphocytic leukemia. A practical aspect. *Hematol Oncol*. 2002; 20: 103-46.
43. Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2004; 13: 279-87.
44. Montserrat E. New prognostic markers in CLL. In: Berliner N, Linker C, Schiffer CA (eds). *American Society of Hematology Education Book*. Washington: 2006; 279-84.
45. Chen J, McMillan NAJ. Molecular basis of pathogenesis, prognosis and therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Can Biol Ther* 2008; 7: 174-79.
46. Linet MS, Schubauer-Berigan MK, Weisenburger DD, Richardson DB, Landgren O, Blair A. Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. *Br J Haematol* 2007; 139: 672-86.
47. Chiorazzi N. Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20: 399-413.
48. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 2005; 115: 755-64.
49. Montserrat E, Moreno C. Chronic lymphocytic leukaemia: a short review. *Ann Oncol* 2008; 19: 320-25.
50. Patel DV, Rai KR. Chronic lymphocytic leukemia. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P (eds). *Hematology, Basic Principles and Practice*. 4th edition. Philadelphia: Elsevier, 2005; 1437-54.
51. Shanafelt TD, Kay NE. The clinical and biological importance of neovascularization and angiogenic signaling pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006; 33: 174-185.
52. Inamdar KV, Bueso-Ramos CE. Pathology of chronic lymphocytic leukemia: an update. *Ann Diag Pathol* 2007; 11: 363-89.

- 53.** Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med* 2008; 264: 549-62.
- 54.** Pleyer L, Egle A, Hartmann TN, Greil R. Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6: 405-18.
- 55.** Stamatopoulos K, Belessi C, Hadzidimitriou A, Smilevska T, Kalagiakou E, Hatzi K. Immunoglobulin light chain repertoire in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005; 106: 3575-83.
- 56.** Dighiero G. CLL biology and prognosis. In: Berliner N, Lee SJ, Linenberger M, Vogelsang GB (eds). *American Society of Hematology Education Book*. Washington: 2005; 278-84.
- 57.** Plass C, Byrd JC, Raval A, Tanner SM, De la Chapelle A. Molecular profiling of chronic lymphocytic leukaemia: genetics meets epigenetics to identify predisposing genes. *Br J Haematol* 2007; 139: 744-52.
- 58.** Montserrat E, Gomis F, Vallespi T. Presenting features and prognosis of chronic lymphocytic leukemia in younger adults. *Blood* 1991; 78: 1545-51.
- 59.** Kedar V, Inamdar MD, Carlos E PhD, Bueso-Ramos MD. Pathology of chronic lymphocytic leukemia: an update. *Annals of Diagnostic Pathology* 2007; 11: 363–89.
- 60.** Cerroni L, Zenahlik P, Hofler G. Specific cutaneous infiltrates of B-cell chronic lymphocytic leukemia: a clinicopathologic and prognostic study of 42 patients. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1000-10.
- 61.** Diehl LF, Ketchum LH. Autoimmune disease and chronic lymphocytic leukemia: autoimmune hemolytic anemia, pure red cell aplasia, and autoimmune thrombocytopenia. *Semin Oncol* 1998; 25: 80-97.
- 62.** Zenz T, Döhner H, Stilgenbauer S. Genetics and risk stratified approach to therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007; 20: 439-53.
- 63.** Kharfan-Dabaja MA, Chavez JC, Khorfan KA, Pinilla-Ibarz J. Clinical and therapeutic implications of the mutational status of IgVH in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2008; 113: 897-906.
- 64.** Cheson BD, Bennett JM, Grever M. National Cancer Institute–sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996; 87: 4990-97.
- 65.** Harris NL, Jaffe ES, Stein H. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84: 1361-92.
- 66.** Batata A, Shen B. Chronic lymphocytic leukemia with low lymphocyte count. *Cancer* 1993; 71: 2732-38.

67. Matutes E, Polliack A. Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2000; 4: 22-47.
68. B. J. Bain, D. M. Clark and B. S. Wilkins. *Bone Marrow Pathology*, Fourth Edition. Wiley Blackwell 2010; 300-19.
69. Schade U, Bock O, Vornhusen S. 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* 2006; 37: 1153-61.
70. Kim YS, Ford Jr RJ, Faber JA. B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma involving bone marrow with an interfollicular pattern. *Am J Clin Pathol* 2000; 114: 41-46.
71. Batata A, Shen B. Relationship between chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma. A comparative study of membrane phenotypes in 270 cases. *Cancer* 1992; 70: 625-32.
72. Yin CC, Lin P, Carney DA. Chronic lymphocytic leukemia/ small lymphocytic lymphoma associated with IgM paraprotein. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 594-602.
73. Edelman M, Evans L, Zee S. Splenic micro-anatomical localization of small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia using a novel combined silver nitrate and immunoperoxidase technique. *Am J Surg Pathol* 1997; 21: 445-52.
74. Nolan P. Chronic lymphatic leukaemia presenting as severe obstructive sleep apnoea. *Respirology* 1996; 1: 299-301.
75. Faigel DO, Vaughn DJ, Furth EE. Chronic lymphocytic leukemia: an unusual cause of upper gastrointestinal hemorrhage. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 635-37.
76. Swerdlow SH, Zellner DC, Hurtubise PE. Pleural involvement in B-cell chronic lymphocytic leukemia associated with a T-cell-rich "reactive" pleural effusion. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 172-74.
77. Assiri AH, Lamba M, Veinot JP. Chronic lymphocytic leukemia involving the coronary arteries with accompanying acute myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol* 2005; 14:324-6.
78. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994;8: 1640-45.
79. Caligaris-Cappio F. B-chronic lymphocytic leukemia: a malignancy of anti-self B cells. *Blood* 1996; 87: 2615-20.
80. Morikawa K, Oseko F, Morikawa S. Induction of CD5 antigen on human CD5- B cells by stimulation with *Staphylococcus aureus* Cowan strain I. *Int Immunol* 1993; 5: 809-16.
81. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigenreceptors. *J Clin Invest* 1998; 102:1515-25.

- 82.** De Rossi G, Mauro FR, Lo Coco F. CD5 negative lymphocytosis mimicking typical B-chronic lymphocytic leukaemia. Description of 26 cases. *Nouv Rev Fr Hematol* 1993; 35: 451-55.
- 83.** Efstathiou S, Tsioulos D, Zacharos I. The prognostic role of CD5 negativity in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: a case-control study. *Haematologia (Budap)* 2002; 32: 209-18.
- 84.** Reinisch W, Willheim M, Hilgarth M. Soluble CD23 reliably reflects disease activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 1994; 12: 2146-52.
- 85.** Hubl W, Iturraspe J, Braylan RC. FMC7 antigen expression on normal and malignant B-cells can be predicted by expression of CD20. *Cytometry* 1998; 34: 71-4.
- 86.** Huh YO, Pugh WC, Kantarjian HM. Detection of subgroups of chronic B-cell leukemias by FMC7 monoclonal antibody. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 283-89.
- 87.** Garcia Vela J, Delgado I, Benito L. CD79b expression in B cell chronic lymphocytic leukemia: its implication for minimal residual disease detection. *Leukemia* 1999; 13: 1501-55.
- 88.** Gordon MS, Kato RM, Lansigan F. Aberrant B cell receptor signaling from B29 (Igbeta, CD79b) gene mutations of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5504-9
- 89.** Schlette E, Medeiros LJ, Keating M. CD79b expression in chronic lymphocytic leukemia. Association with trisomy 12 and atypical immunophenotype. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 561-66.
- 90.** Hanada M, Delia D, Aiello A. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993; 82: 1820-28.
- 91.** Saxena A, Viswanathan S, Moshynska O. Mcl-1 and Bcl-2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2004; 75: 22-33.
- 92.** Kimby E, Rincon J, Patarroyo M. Expression of adhesion molecules CD11/CD18 (Leu-CAMs, beta 2-integrins), CD54 (ICAM-1) and CD58 (LFA-3) in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1994; 13: 297-306.
- 93.** Lucio PJ, Faria MT, Pinto AM. Expression of adhesion molecules in chronic B-cell lymphoproliferative disorders. *Haematologica* 1998; 83: 104-11.
- 94.** Baldini LG, Cro LM. Structure and function of VLA integrins: differential expression in B-cell leukemia/lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1994; 12: 197-203.
- 95.** Sembries S, Pahl H, Stilgenbauer S. Reduced expression of adhesion molecules and cell signaling receptors by chronic lymphocytic leukemia cells with 11q deletion. *Blood* 1999; 93: 624-31.

- 96.** Christiansen I, Gidlöf C, Wallgren AC. Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule 1 are increased in chronic B-lymphocytic leukemia and correlate with clinical stage and prognostic markers. *Blood* 1994; 84: 3010-16.
- 97.** Horst E, Meijer CJ, Radaskiewicz T. Expression of a human homing receptor (CD44) in lymphoid malignancies and related stages of lymphoid development. *Leukemia* 1990; 4: 383-9.
- 98.** Hamblin T. Chronic lymphocytic leukaemia: one disease or two? *Ann Hematol* 2002; 81: 299-303.
- 99.** Oscier D, Fegan C, Hillmen P, Illidge T, Johnson S, Maguire P. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2004; 125: 294-317.
- 100.** Montserrat E, Sanchez-Bisno J, Vinolas N. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 1986; 62: 567-75.
- 101.** Hallek M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol* 2008; 19: 51-53.
- 102.** Binet JL, Caligaris-Cappio F, Catovsky D, Cheson B, Davis T, Dighiero G. Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 107: 859-61.
- 103.** Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical Staging of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 1975; 46: 219-34.
- 104.** Rai KR, Han T. Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990; 4: 447-56.
- 105.** Hamblin TJ. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007; 20: 455-68.
- 106.** Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1987; 60: 2712-16.
- 107.** Magnac C, Porcher R, Davi F, Nataf J, Payelle-Brogard B, Tang RP, Oppezio P, Levy V, Dighiero G, Ajchenbaum-Cymbalista F. Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. *Leukemia* 2003; 17: 133-37.
- 108.** Gray JL, Jacobs A, Block M. Bone marrow and peripheral blood lymphocytosis in the prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1974; 33: 1169-78.
- 109.** Rywlin AM. Letter: Bone marrow biopsy and aspiration. *Am J Clin Pathol* 1976; 66: 617-18.
- 110.** Han T, Barcos M, Emrich L. Bone marrow infiltration patterns and their prognostic significance in chronic lymphocytic leukemia: correlations with clinical, immunologic, phenotypic, and cytogenetic data. *J Clin Oncol* 1984; 2: 562-70.
- 111.** Rozman C, Hernandez-Nieto L, Montserrat E. Prognostic significance of bone-marrow patterns in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1981; 47: 529-37.

- 112.** 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* 1984; 64: 642-48.
- 113.** 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* 2005; 90; 391-99.
- 114.** 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* 1999; 93: 1732-37.
- 115.** Matthews C, Catherwood MA, Morris TC. Serum TK levels in CLL identify Binet stage A patients within biologically defined prognostic subgroups most likely to undergo disease progression. *Eur J Haematol* 2006; 77: 309-17.
- 116.** Di Giovanni S, Valentini G, Carducci P. Beta-2-microglobulin is a reliable tumor marker in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol* 1989; 81: 181-85.
- 117.** Molica S, Levato D, Cascavilla N, Levato L, Musto P. Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and B2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1999; 62: 117-22.
- 118.** Fournier S, Rubio M, Delespesse G. Role for low-affinity receptor for IgE (CD23) in normal and leukemic B-cell proliferation. *Blood* 1994; 84: 1881-86.
- 119.** Saka B, Aktan M, Sami U. Prognostic importance of soluble CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lab Haematol* 2006; 28: 30-5.
- 120.** Schwarzmeier JD, Shehata M, Hilgarth M. The role of soluble CD23 in distinguishing stable and progressive forms of B-chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 549-54.
- 121.** Fenaux P, Preudhomme C, Lai JL. Mutations of the p53 gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a report on 39 cases with cytogenetic analysis. *Leukemia* 1992; 6: 246-50.
- 122.** Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* 1994; 84: 3148-57.
- 123.** Dohner H, Fischer K, Bentz M. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 1995; 85: 1580-89.
- 124.** Piette J, Neel H, Marechal V. Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene* 1997; 15: 1001-10.

- 125.** Giles FJ, O'Brien SM, Keating MJ. Chronic lymphocytic leukemia in (Richter's) transformation. *Semin Oncol* 1998; 25: 117-25.
- 126.** Mauro FR, Foa R, Giannarelli D. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood* 1999; 94: 448-54.
- 127.** Thornton PD, Fernandez C, Giustolisi GM. CD38 expression as a prognostic indicator in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol J* 2004; 5: 145-51.
- 128.** Faguet GB. Chronic lymphocytic leukemia: an updated review. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1974-90.
- 129.** Krober A, Seiler T, Benner A. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 1410-16.
- 130.** 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* 2006; 70: 214-217.
- 131.** 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* 2006; 47: 2371-2379.
- 132.** Deaglio S, Aydin S, Vaisitti T, Bergui L, Malavasi F. CD38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target. *Trends in Mol Med* 2008;14: 210-18.
- 133.** 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* 2007; 82: 1063-70.
- 134.** Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. CD38 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* 2002; 99: 1023-29.
- 135.** Zhang J, Siraganian RP. CD45 is essential for Fc epsilon RI signaling by ZAP70, but not Syk, in Syk-negative mast cells. *J Immunol* 1999; 163: 2508-16.
- 136.** Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003; 101: 4944-51.
- 137.** Admirand JH, Rassidakis GZ, Abruzzo LV. Immunohistochemical detection of ZAP-70 in 341 cases of non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. *Mod Pathol* 2004; 17: 954-61.

- 138.** Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 1999; 59: 1693-700.
- 139.** 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*. 2000; 343: 1910-16.
- 140.** Garcia-Marco JA, Price CM, Catovsky D. Interphase cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 94: 52-8.
- 141.** Dohner H, Stilgenbauer S, Dohner K. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med* 1999; 77: 266-81.
- 142.** Glassman A, Hayes KJ. The value of fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005; 158, 88-91.
- 143.** Dyer MJ, Zani VJ, Lu WZ. BCL2 translocations in leukemias of mature B cells. *Blood* 1994; 83: 3682-88.
- 144.** Liu Y, Grander D, Soderhall S. Retinoblastoma gene deletions in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1992; 4: 250-56.
- 145.** Liu Y, Szekely L, Grander D. Chronic lymphocytic leukemia cells with allelic deletions at 13q14 commonly have one intact RB1 gene: evidence for a role of an adjacent locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8697-701.
- 146.** Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99: 1524-29.
- 147.** Calin GA, Ferracin M, Cimmino A. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 353: 1793-801.
- 148.** Mehes G. Chromosome Abnormalities with Prognostic Impact in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Pathol Oncol Res*. 2005; 11: 205-10.
- 149.** Dohner H, Stilgenbauer S, James MR. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 1997; 89: 2516-22.
- 150.** Dickinson JD, Gilmore J, Iqbal J. 11q22.3 deletion in B-chronic lymphocytic leukemia is specifically associated with bulky lymphadenopathy and ZAP-70 expression but not reduced expression of adhesion/cell surface receptor molecules. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 231-44.
- 151.** Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 748-53.

- 152.** Kalla C, Scheuermann MO, Kube I. Analysis of 11q22-q23 deletion target genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: evidence for a pathogenic role of NPAT, CUL5, and PPP2R1B. *Eur J Cancer* 2007; 43: 1328-35.
- 153.** Que TH, Marco JG, Ellis J. Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia detected by fluorescence in situ hybridization: analysis by stage, immunophenotype, and morphology. *Blood* 1993; 82: 571-75.
- 154.** Escudier SM, Pereira-Leahy JM, Drach JW. Fluorescent in situ hybridization and cytogenetic studies of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993;81:2702-7.
- 155.** Winkler D, Schneider C, Krober A. Protein expression analysis of chromosome 12 candidate genes in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia* 2005; 19: 1211-15.
- 156.** Juliusson G, Gahrton G. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Pathogenetic and clinical implications. *Cancer Genet Cytogenet* 1990;45:143-60.
- 157.** Offit K, Louie DC, Parsa NZ. Clinical and morphologic features of B-cell small lymphocytic lymphoma with del(6)(q21q23). *Blood* 1994; 83: 2611-18.
- 158.** Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R. Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia* 2004; 18: 476-83.
- 159.** Imamura J, Miyoshi I, Koeffler HP. p53 in hematologic malignancies. *Blood* 1994; 84: 2412-21.
- 160.** Asou H, Takechi M, Tanaka K. Japanese B cell chronic lymphocytic leukaemia: a cytogenetic and molecular biological study. *Br J Haematol* 1993; 85: 492-97.
- 161.** Raffeld M, Jaffe ES. bcl-1, t(11;14), and mantle cell-derived lymphomas. *Blood* 1991; 78: 259-63.
- 162.** Jaffe ES, Harris NL, Stein H. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001: 168-70.
- 163.** Soma LA, Gollin SM, Remstein ED. Splenic small B-cell lymphoma with IGH/BCL3 translocation. *Hum Pathol* 2006; 37: 218-30.
- 164.** 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* 2001; 97: 256-63.
- 165.** 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* 2002; 100: 1215-19.

- 166.** 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* 1996; 10: 456-59.
- 167.** Bouafia F, Drai 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* 2004; 91: 229-40.
- 168.** Pan L, Beveley PCL & Isaacson PG. Lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes and proliferative activity of lymphoid cells-an immunocytochemical study. *Clin Exp Immunol* 1991; 86: 240-45.
- 169.** Kroft SH. Lymphoma transformation: genetic relatedness, stealth lymphomas, and the final frontier. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 811-14.
- 170.** Matolcsy A, Inghirami G, Knowles DM. Molecular genetic demonstration of the diverse evolution of Richter's syndrome (chronic lymphocytic leukemia and subsequent large cell lymphoma). *Blood* 1994; 83: 1363-72.
- 171.** Tsimberidou AM, Keating MJ. Richter syndrome: biology, incidence, and therapeutic strategies. *Cancer* 2005; 103: 216-28.
- 172.** Robertson LE, Pugh W, O'Brien S. Richter's syndrome: a report on 39 patients. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1985-89.
- 173.** Matolcsy A, Chadburn A, Knowles DM. De novo CD5-positive and Richter's syndrome-associated diffuse large B cell lymphomas are genotypically distinct. *Am J Pathol* 1995; 147: 207-16.
- 174.** Fegan C, Robinson H, Thompson P. Karyotypic evolution in CLL: identification of a new sub-group of patients with deletions of 11q and advanced or progressive disease. *Leukemia* 1995; 9: 2003-8.
- 175.** Pescarmona E, Pignoloni P, Mauro FR. Hodgkin/Reed- Sternberg cells and Hodgkin's disease in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia: an immunohistological, molecular and clinical study of four cases suggesting a heterogeneous pathogenetic background. *Virchows Arch* 2000; 437: 129-32.
- 176.** Melo JV, Wardle J, Chetty M. The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. Evaluation of cell size by morphology and volume measurements. *Br J Haematol* 1986; 64: 469-78.
- 177.** Schlette E, Bueso-Ramos C, Giles F. Mature B-cell leukemias with more than 55% prolymphocytes. A heterogeneous group that includes an unusual variant of mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2001; 115: 571-81.

- 178.** Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997; 90: 2863-92.
- 179.** Asaad NY, El-Wahed MMA, Dawoud MM. Diagnosis and prognosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (BCLL/ SLL) and mantle cell lymphoma (MCL). *J Egypt Natl Canc Inst* 2005; 17: 279-90.
- 180.** Cohen PL, Kurtin PJ, Donovan KA. Bone marrow and peripheral blood involvement in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 1998; 101: 302-10.
- 181.** Kurtin PJ. Mantle cell lymphoma. *Adv Anat Pathol*. 1998; 5: 376-98.
- 182.** Coiffier B, Hiddemann W, Stein H. Mantle cell lymphoma: a therapeutic dilemma. *Ann Oncol* 1995; 6: 208-10.
- 183.** Medeiros LJ, Carr J. Overview of the role of molecular methods in the diagnosis of malignant lymphomas. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 1189-207.
- 184.** Berinstein NL, Reis MD, Ngan BY. Detection of occult lymphoma in the peripheral blood and bone marrow of patients with untreated early-stage and advanced-stage follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1344-52.
- 185.** Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *J Clin Pathol* 1989; 42:567-84.
- 186.** Callet-Bauchu E, Renard N, Gazzo S. Distribution of the cytogenetic abnormality +i(3) (q10) in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis: a FICTION study in three cases. *Br J Haematol* 1997; 99: 531-36.
- 187.** Marti GE, Rawstron AC, Ghia P. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol* 2005; 130: 325-32.
- 188.** Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, Kuma K, Hayashida H, Miyata T. The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J Exp Med* 1998; 188: 2151–62.
- 189.** Van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2001; 17: 2257- 317.
- 190.** Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. Lymphocyte Maturation and Expression of Antigen Receptor Genes. 2000; 175-181.

- 191.** Ritgen M, Lange A, Stilgenbauer S. Unmutated immunoglobulin variable heavy-chain gene status remains an adverse prognostic factor after autologous stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003; 101: 2049-53.
- 192.** Tobin G, Thunberg U, Johnson A. Somatically mutated Ig V(H) 3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99: 2262-64.
- 193.** Bene MC. What Is ZAP-70? *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70: 204-08.
- 194.** Deindl S, Kadlecsek TA, Brdicka T, Cao X, Weiss A, Kuriyan J. Structural basis for the inhibition of tyrosine kinase activity of ZAP-70. *Cell* 2007; 129: 735-46.
- 195.** Amin S, Parker A, Mann J. ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Biochem Cell Biol* 2007: 1-5.
- 196.** Sheridan R, Mounajjed T, Ehrmann DE, Hurtubise PE, Schrager A. Comparison of Bone Marrow and Peripheral Blood ZAP-70 Status Examined by flow Cytometric Immunophenotyping in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cytometry.B Clin Cytom* 2006; 70: 320-21.
- 197.** 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* 2006; 108: 853-61.
- 198.** Montserrat E. New prognostic markers in CLL. *Hematology* 2006; 279-84.
- 199.** Mehta K, Shahid U, and Malavasi F. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions with multiple functions. *FASEB J.* 1996; 10:1408-17.
- 200.** Alessio M, Roggero S, Funaro A, De Monte L B, Peruzzi L, Geuna M, Malavasi F. CD38 molecule: Structural and biochemical analysis of human T lymphocytes, thymocytes and plasma cells *J Immunol* 1990; 145: 878-84.
- 201.** Matrai Z. CD38 as a prognostic marker in CLL. *Hematology* 2005; 10: 39-46.
- 202.** Krishnaswamy G, Kang B N, Panettieri A R, Douglas N, F Walseth T, Kannan M S. Regulation of the CD38 promoter in human airway smooth muscle cells by TNF and dexamethasone *Respiratory Research.* 2008; 9:26.
- 203.** Funaro A, Reinis M, Trubiani O, Santi S, Di Primio R, Malavasi F. CD38 functions are regulated through an internalization step. *J Immunol* 1998; 160: 2238-47.
- 204.** Grant A O, John J E, Nesterenko V V, Starmer C F, Moorman J R. The role of inactivation in open-channel block of the sodium channel: studies with inactivation-deficient mutant channels. *Mol Pharmacol* 1996: 1643-50.

- 205.** Ellis J H, Stevenson G T, Crowe J S. Engineered anti-CD38 monoclonal antibodies for immunotherapy of multiple myeloma. *J Immunol* 1995; 155: 925- 37.
- 206.** David Dabbs. Diagnostic Immunohistochemistry Theranostic and Genomic applications. Third Edition, Sunders Elsevier: 2010; 169-70.
- 207.** Bojarska-Junak A, Rolinski J, Kawiak J. Modification of immunocytochemical ZAP-70 assay for potential clinical application in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Folia Histochem Cytobiol* 2005; 43: 19-23.
- 208.** Münci Yağcı, Kronik lenfositik lösemide ağır zincir gen mutasyonlarının önemi: derleme. *Türkiye klinikleri J Hem Onc-Special Topics* 2009; 2: 35-40.
- 209.** Binet JL, Auguier A, Dighiero G. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;198-206.
- 210.** International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Chronic Lymphocytic Leukemia: Recommendations for Diagnosis, Staging and Response Criteria. *Annals of Internal Medicine* 1989; 110: 236-38.
- 211.** Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, Buccisano F, Epiceno AM. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98: 2633-39.
- 212.** Chen L, Zhang Y, Zheng W. Distinctive IgVH gene segments usage and mutation status in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2008; 32:1491–98.
- 213.** Farsangi M H, Tehrani M J, Razavi S M, Sharifian R A, Mellstedt H, Shokri F, Rabbani H. Immunoglobulin heavy chain variable region gene usage and mutational status of the leukemic B cells in Iranian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Sci* 2009; 100: 2346–53.
- 214.** Admirand J H, Knoblock R J, Coombes K R, Tam C, Schlette E J, M.D, Keating M J, Luthra R, Medeiros J, Abruzzo L V. Immunohistochemical detection of ZAP70 in chronic lymphocytic leukemia predicts immunoglobulin heavy chain gene mutation status and time to progression. *Mod Pathol* 2010; 23: 1518–23.
- 215.** Messmer BT, Raphael BJ, Aerni SJ. Computational identification of CDR3 sequence archetypes among immunoglobulin sequences in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2009; 33: 368–76.
- 216.** Nakahashi H, Tsukamoto N, Hashimoto Y. Characterization of immunoglobulin heavy and light chain gene expression in chronic lymphocytic leukemia and related disorders. *Cancer Sci* 2009; 100: 671–77.
- 217.** Khoudoleeva O, Gretsov E, Barteneva N. Proliferative index and expression of CD38, Zap-70, and CD25 in different lymphoid compartments of chronic lymphocytic leukemia patients. *Pathol Lab Med Int* 2011; 3:7-16.

- 218.** Zupo S, Isnardi L, Megna M, Massara R, Malavasi F. CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood* 1996; 88: 1365-74.
- 219.** Chevallier P, Penther D, Avet-Loiseau H, Robillard N, Ifrah N. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 2002; 116: 142-50.
- 220.** Morabito F, Mangiola M, Oliva B, Stelitano C, Callea V. Peripheral blood CD38 expression predicts survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2001; 25: 927-32.
- 221.** Domingo-Domenech E, Domingo-Claros A, Gonzalez-Bora E, Benitez D, Alonso E. CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: association with clinical presentation and outcome in 155 patients. *Haematologica* 2002; 87:1021-27.
- 222.** Ottaggio L, Viaggi S, Zunino A, Zupo S, Rossi E. Chromosome aberrations evaluated by comparative genomic hybridization in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with CD38 expression. *Haematologica* 2003; 88: 769-77.
- 223.** Korac' P, Ajdukovic' R, Mariana M, Paro K, Jaks'ic' B, Dominis M. Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia. *J Mol Hist* 2009; 40: 81–86.
- 224.** Morilla A, De Castro D G, Del Giudice I, Osuji N, Else M, Morilla R, Babapulle V B. Combinations of ZAP-70, CD38 and IGHV mutational status as predictors of time to first treatment in CLL. *Leu & Lymph* 2008; 49: 2108–15.
- 225.** D'Arena G, Tarnani M, Rumi C, Vaisitti T, Aydin S. Prognostic significance of combined analysis of ZAP-70 and CD38 in chronic lymphocytic leukemia. *Am j Hematol* 2007; 82: 787-91.
- 226.** 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* 2005; 19: 750-58.
- 227.** 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* 2005; 104: 2124-32.
- 228.** Rivkina A, Vitols G, Murovska M, Lejniece S. Identifying the stage of new CLL patients using TK, ZAP-70, CD38 levels. *Exp Oncol* 2011; 33: 99-103.