

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİLİ OLGULARDA
MDM2 ONKOGENİNİN AKTİVASYONUNUN
BELİRLENMESİ

Şule DARBAŞ

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2014

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİLİ OLGULARDA MDM2 ONKOGENİNİN AKTİVASYONUNUN BELİRLENMESİ

Şule DARBAŞ

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Taraından Desteklenmiştir. (Proje No: 2013.02.0122.004)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya,2014

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Yüksek Lisans Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.
16 /06 / 2014

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. İbrahim KESER**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : **Yrd. Doç. Dr. Ozan SALİM**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun / / tarih ve /sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) tanısı almış olgularda Murine double minute-2 (*MDM2*) genine spesifik prob seti kullanılarak Floresan *In Situ* Hibridizasyon (FISH) tekniğiyle *MDM2* gen amplifikasyonunun olup olmadığının, amplifikasyonun belirlendiği taktirde, bu amplifikasyon ile hastalığın seyri, tedavi endikasyonu ile ilişkisi ve ilaca dirençlilik arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Akdeniz Üniversitesi Hematoloji Bilim Dalı'nda çalışmaya dahil edilen KLL tanısı almış 40 olguya ve kontrol grubu olarak da KML tanısı almış 20 olguya ait rutin kromozom analizi için gelen kemik iliği aspirasyon örneklerinden harvest edilerek elde edilen kromozom yaymalarından FISH yöntemi ile 12 numaralı kromozomda lokalize olan *MDM2* gen amplifikasyonuna bakılmıştır. Ayrıca hastaların rutin FISH ve konvansiyonel sitogenetik sonuçları incelenmiştir.

Çalışmadaki 40 olguda ve kontrol grubu olarak 20 KML olgusunda *MDM2* gen amplifikasyonu belirlenmezken, 12 hastada (%30) trizomi 12 gözlenmiştir. Ayrıca çalışma grubundaki 40 KLL hastasının rutin FISH analizinde; 16' sında (% 40) 17p13 delesyonu, 13 hastada (% 32,5) 13q14 delesyonu, 6 hastada (% 15) 11q22.3 delesyonu ve 1 hastada (% 2,5) 6q23 delesyonu saptanmıştır.

KLL olgularında FISH yöntemi ile *MDM2* gen amplifikasyonunun gözlenmemesi nedeni ile bu olgularda mRNA düzeyinde overekspresyon olup olmadığına bakılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca gen amplifikasyonu olmayan özellikle ileri evredeki olgularda *MDM2* geninin 309. pozisyonundaki G/G genotipine sahip olup olmadıklarına da bakılması gerektiği düşüncesindeyiz.

Hastaların 27' si (% 67,5) erken evre olup tedavi endikasyonu olmayan hastalardır. Bu hastaların takiplerinde tedavi endikasyonu gelişmesi durumunda tekrar *MDM2* gen amplifikasyonuna ve ekspresyonuna bakılması *MDM2* - KLL ilişkisini açıklamaya daha yararlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler:*MDM2*, KLL, FISH, *P53*

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate *MDM2* gene copy number alterations in Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL) patients with Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) technique by using Murine double minute 2 (*MDM2*) gene-specific probe sets, and also to evaluate the possible relationship between this amplification and the disease course, indication for treatment and drug resistance.

Copy number alterations of *MDM2* gene which located on chromosome 12 were investigated by FISH technique using metaphase chromosomes obtained from bone marrow aspiration samples for routine chromosome analysis in 40 CLL and 20 Chronic Myeloid Leukemia (CML) patients those followed-up at Akdeniz University Department of Haematology. Additionally, routine FISH and conventional cytogenetics results of the patients were evaluated.

MDM2 gene amplification was not observed in patient cohort (CLL) and in control patients (CML). Trisomy 12 FISH signal pattern was observed in 12 out of 40 CLL patients (30%). Furthermore, chromosomal alterations detected by routine FISH analysis in 40 CLL patients were as follows; 17p13 deletion in 16 cases (40%), 13q14 deletion in 13 patients (32.5%), 11q22.3 deletion in 6 patients (15%), and 6q23 deletion in 1 case (2.5%).

We thought that, evaluation of *MDM2* mRNA expression levels in CLL patients might be conducted due to absence of *MDM2* gene copy number alterations. Additionally, evaluation of SNP309 G/G single nucleotide polymorphism in advanced stage CLL patients without *MDM2* gene amplification might provide important clues for progression disease.

27 out of the 40 CLL patients (67.5%) were classified as having early stage disease. We can suggest that in the case of progression to advanced stage CLL during the follow-up period, re-evaluation of *MDM2* gene copy number alterations will be more useful to explain the relationship between copy number alterations of *MDM2* gene and CLL.

Key Words:*MDM2*, CLL, FISH, *P53*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca ve tez çalışmam esnasında desteğini, ilgisini ve yardımını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatını bulduğum başta Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı ve danışman hocam sayın Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM' e ve diğer öğretim üyelerine,

Göstermiş olduğu anlayış ve iyi niyetinden dolayı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Fahri UÇAR' a ve Doku Tipleme Laboratuvar' ındaki tüm çalışma arkadaşlarıma,

Tez çalışmamın kapsamındaki olguların klinik eliminasyonunda yardımlarını esirgemeyen Hematoloji Bilim Dalı öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Ozan SALİM'e

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Dr. Çiğdem AYDIN ACAR' a ve Akdeniz Üniversitesi Genetik Tanı Merkezi'nin çalışanlarına,

Anabilim Dalımız sekreterine ve tüm asistan arkadaşlarıma,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürüne, Sekreterine ve tüm çalışanlarına

Tüm eğitimim boyunca verdikleri destek ve gösterdikleri sevgi için anneme, babama ve ablama en içten dileklerimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
GRAFİK DİZİNİ	xiv
 GİRİŞ VE AMAÇ	 1
 GENEL BİLGİLER	
2.1. Kronik Lenfositik Lösemi	3
2.2. Küçük Lenfositik Lenfoma	5
2.3. Kronik Lenfositik Lösemi' de Prognozu Etkileyen Faktörler	5
2.3.1. Serolojik Belirteçler	5
2.3.1.1. B ₂ Mikroglobulin	5
2.3.1.2. Serum Timidin Kinaz Aktivitesi	6
2.3.1.3. Serum LDH Düzeyi	6
2.3.1.4. Serum CD23 Düzeyi	6
2.3.1.5. CD38 Ekspresyonu	7
2.3.1.6. ZAP70 Ekspresyonu	8

2.3.2.	İmmüfenotip Analiz	10
2.3.3.	Sitokinler	11
2.3.4.	Kemik İnfiltrasyon Tipi – Lenfosit Katlanma Zamanı	13
2.3.5.	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü	13
2.3.6.	Genetik Abnormaliteler	14
2.3.6.1.	<i>p53</i> Tümör Baskılayıcı Gen ve <i>MDM2</i>	15
2.3.6.2.	11q22.3 Delesyonu	18
2.3.6.3.	Trizomi 12	18
2.3.6.4.	13q14 Delesyonu	18
2.3.6.5.	Daha Az Sıklıkla Görülen Kromozomal Abnormaliteler	19
2.3.6.6.	Sitogenetik Abnormalite Saptanamayan KLL’ ler	19
2.3.6.7.	IgVH Mutasyonu	19
2.4.	KLL ve Apoptoz	21
2.5.	Tedavi	22
2.5.1.	Tedavi Öncesi Değerlendirme	22
2.5.2.	Tedavi Endikasyonları	22
2.5.3.	Yanıt Değerlendirme	25
2.5.4.	KLL Hastalarında Destek Tedavisi	25
2.5.5.	Tedavi ve Sitogenetik	26

MATERYAL VE METOT

3.1.	Floresan <i>In Situ</i> Hibridizasyon Yöntemi	27
3.1.1.	Kullanılan Solüsyonlar	27
3.1.2.	Kullanılan Floresan <i>In Situ</i> Hibridizasyon Probenin İçeriği	28
3.1.3.	Floresan <i>In Situ</i> Hibridizasyon Tekniğinin Uygulanması	28
3.1.3.1.	Preparatın Hazırlanması	29
3.1.3.2.	Preparatın Dehidratasyon Aşaması	29
3.1.3.3.	Denatürasyon Aşaması / Hibridizasyon Aşaması	30
3.1.3.4.	Hibridizasyon Sonrası Yıkama	30

BULGULAR	31
-----------------	-----------

TARTIŞMA	45
-----------------	-----------

SONUÇLAR	49
-----------------	-----------

KAYNAKLAR	50
------------------	-----------

ÖZGEÇMİŞ	68
-----------------	-----------

EKLER

Ek-1: Aydınlatılmış Onan Formu

SİMGELER VE KISALTMALAR

KLL	:	Kronik Lenfositik Lösemi
CD	:	Cluster of Differentiation
IgVH	:	İmmünglobulin Ağır Zincir
VEGF	:	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
MDM2	:	Murine Double Minute 2
B₂M	:	Beta 2 Mikroglobulin
LDH	:	Laktat Dehidrojenaz
FISH	:	Floresan İn Situ Hibridizasyon
sIg	:	Yüzey İmmunoglobulin
K İ	:	Kemik İliği
LKS	:	Lenfosit Katlanma Süresi
ZAP70	:	Zeta-associated Protein
MHL	:	Mantle Hücreli Lenfoma
sTK	:	Serum Timidin Kinaz
NK	:	Naturel Killer
THR	:	T Hücre Reseptör
BCR	:	B Hücre Reseptör Kompleksi
IL	:	İnterlökin
IFN-γ	:	İnterferon Gama
TNF-α	:	Tümör Nekrozis Faktör
GMCSF	:	Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
TGF-β	:	Transforme Edici Büyüme Faktörü
KML	:	Kronik Myeloid Lösemi
qRT-PCR	:	Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
E2F	:	Transkripsiyon Uzama Faktörü

SNP	:	Tek Nükleotid Polimorfizmi
ATM	:	Ataksi Telenjektazi Mutasyonu
pRb	:	Retinoblastoma Proteini
SLL	:	Küçük Lenfositik Lenfoma
SSC	:	Sodyum Salin Sitrat
NP40	:	Nonident P 40 Substitute
HCL	:	Hidrojen Klorür
PBS	:	Fosfat Buffer Salin
DAPI	:	4,6 Diamino-2-Fenilindol
RT-PCR	:	Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

TABLO DİZİNİ

Tablo		Sayfa
1.	KLL' de Klinik Evreleme Sistemleri	5
2.	KLL İmmünofenotiplemesi	11
3.	KLL' de En Sık Gözlenen Sitogenetik Belirteçler	15
4.	IgVH Bölgesinde Somatik Mutasyonu Olan ve Olmayan KLL Hastalarının Klinik ve Biyolojik Özellikleri	20
5.	Çalışmaya Alınan Hastaların Yaş, Cinsiyet, Konvansiyonel Sitogenetik ve Moleküler Sitogenetik Sonuçları İle Uygulanan Tedavi ve Tedaviye Yanıt Sonuçları	32
6.	FISH analizi ile saptanan trizomi 12' li olgular ve klinik durum	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
1. T Hücre Aktivasyonu	9
2. MDM2 Protein Yapısı	17
3-a. <i>MDM2</i> Genine Spesifik Prob İle Yapılan FISH Uygulamalarında Normal Sinal Paterninin Gösterilmesi	42
3-b. <i>MDM2</i> Genine Spesifik Prob İle Yapılan FISH Uygulamalarında Trizomi 12' ye ait Sinyal Paterninin Gösterilmesi	43

GRAFİK DİZİNİ

Grafik	Sayfa
1 Çalışmaya Katılan Hastaların FISH İle Saptanan Kromozom Abnormaliteleri	43

GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik lenfositler lösemi (KLL) apoptoz özelliğini kaybetmiş, olgun görünümlü malign monoklonal lenfositlerin kan, kemik iliği, lenf nodları ve dalağı işgal ederek birikmesi ile karakterli bir hastalıktır (1). Olguların %95' den fazlası B lenfosit, %5' inden azı T lenfosit tipindedir (2). KLL tanısı alan hastalar, kemik iliği infiltrasyonuna bağlı sitopenilerden, hücrel immün bozukluklara bağlı otoimmün hastalıklardan ve neoplazilerden veya hipogammaglobulinemi nedeniyle oluşan enfeksiyon komplikasyonlarından etkilenirler (3,4). KLL' nin klinik seyri son derece değişkendir (5). Bazı hastalarda yavaş seyirli hastalık görülür ve tedavi gerekmez. Kimi olgularda tanıdan kısa bir süre sonra tedavi gereksinimi olur (6). Toplam sağkalım süresi aylar ile sınırlı olabileceği gibi dekadlar ile ifade edilebilecek kadar uzun olabilir. KLL' nin değişken klinik seyrinden dolayı, prognozu kötü olabilecek hastaları önceden belirlemek çok önemlidir (5).

Erişkin yaşta görülen en sık lösemi tipi olan KLL (7), batı ülkelerinde tüm kanserlerin %0.8' ini ve lösemilerin %30' unu teşkil ederken, Asya ülkelerinde ise oldukça az oranda görülmektedir (8). KLL genellikle orta yaş ve yaşlılık dönemi hastalığı olup, 20 yaşın altında görülmesi oldukça nadirdir (9). KLL tanısı, periferik kanda 3 aydan fazla süredir devam eden lenfositoz (ki bu değer ulusal kanser enstitüsü çalışma grubu tarafından 5000 /mikroL olarak belirtilmiştir), immunfenotip pozitifliği (CD5, CD19, CD20 ve CD 23) ve kemik iliğinde % 30' un üzerinde lenfoid hücre hakimiyeti esaslarına dayanır (2).

Rai ve Binet tarafından geliştirilen klinik evreleme sistemleri, erken evrede tanı konmuş hastalardan hangilerinin hızlı seyredeceğini saptamada yetersizdir (5). Bu nedenle KLL' de prognozu belirlemeye yardımcı bazı belirteçler tanımlanmıştır. Bu belirteçler arasında kromozomal anomaliler (del 13q, del 11q, trizomi12, del 17p, del 6q ve IgVH mutasyonu), bir tirozin kinaz olan ZAP70, CD38 düzeyi, beta 2 mikroglobülin (β 2M) düzeyi, laktat dehidrojenaz (LDH) düzeyi, kemik iliğinde infiltrasyon paterni, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), ve klinik evre sayılabilir (5,10).

MDM2 (MURINE double minute-2) geninin yüksek düzeydeki ekspresyonu KLL' li olguların %47' sinde saptanmıştır. KLL' li hastalarda bu genin *p53*' ü bloke ettiği gösterilmiş ve bu yolla programlanmış hücre ölümünü engelleyip, ilaç direnci oluşturduğu savunulmuştur (11). Ancak hastalığın evresi, agresif davranışı ve ilaç direnci ile ilişkisi bulunamamıştır (12).

Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH), nükleik asit problemleri aracılığı ile preparat üzerinde bulunan hücresel ya da kromozomal DNA veya RNA'nın incelenmesi temeline dayanan bir tekniktir. 1969 yılında ilk kez moleküler tekniklerin sitolojik preparatlara uygulanabilirliği saptanmış; ancak ilk dönemlerde radyoaktif maddelerin kullanılması, uygulama süresinin uzun olması ve moleküler klonlama tekniklerinin geliştirilememiş olması bu tekniğin çok yavaş ilerlemesine yol açmıştır. Moleküler klonlama teknikleri ile diğer rekombinant DNA yöntemlerinin büyük bir hızla gelişmesi, FISH tekniğinin ilerlemesini sağlamıştır. Özellikle prob işaretlenmesinde radyoaktif olmayan maddelerin kullanılması ve sinyallerin güçlendirilmesinde immünokimyasal ajanlardan yararlanılması saptandıktan sonra, bu teknikte belirgin bir ilerleme gözlenmiş, çok geniş uygulama alanı bulmuştur. FISH tekniğinin avantajları kolay uygulanabilir olması, duyarlılığı ve güvenilirliğinin yüksek olması, diğer moleküler DNA hibridizasyon yöntemlerine göre rezolüsyon gücünün yüksek olmasıdır (13).

FISH tekniği özellikle lösemilerde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu yöntem sayesinde hastalığa özgü kromozom anomalisini belirleyerek tanı koymak, prognoz takibi yapabilmek, en kısa sürede sonuç vermek, mozaizim tanısı koyabilmek, çok sayıda metafaz ve/veya interfaz hücresinde analiz yapabilmek mümkün olmaktadır. KLL' de, malign B hücrelerini *in vitro* proliferasyona indüklemek zor olduğundan klasik sitogenetik çoğunlukla sonuçsuz kalmaktadır. Bu nedenle bu olgularda interfaz FISH analizi çok değerlidir. FISH ile yapılan çalışmalar sonucunda KLL hastalarının % 80'inde genomik aberasyonlar saptanabilmektedir (14).

Bu çalışmada KLL tanısı almış olgularda FISH yöntemi kullanılarak öncelikle *MDM2* gen amplifikasyonunun varlığını gösterebilmek, gen amplifikasyonu belirlendiği takdirde bunun sıklığını saptayabilmek ve ayrıca *MDM2* gen amplifikasyonunun hastalığın evresi, hastalığın seyri ve ilaca dirençlilikle ilişkisinin olup olmadığını gösterebilmek amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Lenfositik Lösemi

KLL ilk defa 1903 yılında Turk tarafından tanımlanmış ve 1924 yılında Minot ve Isaacs; KLL' nin ayrıntılı klinik tanımını yapmıştır (15). KLL, B veya T lenfositlerinin nispeten olgun hücre döneminden köken alan, olgun görünümlü küçük lenfositlerin kan, kemik iliği, lenf bezi ve dalağa infiltre olması ve lenfositlerin fonksiyon bozukluğu göstermesi ile karakterize kemik iliğinin malign bir hastalığıdır (16).

Yetişkinlerde en sık gözlenen lösemi tipi %25 oranla KLL 'dir (17). Batı toplumlarında yıllık görülme sıklığı 4/100.000 ' dir. Asya ülkelerinde ise bu oran oldukça düşüktür. KLL ileri yaş hastalığı olup erkeklerde kadınlara göre iki kat daha sıklıkta görülmektedir. Tanı anındaki ortalama yaş 65 olmakla birlikte, sıklığı yaşla artmakta ve 70 yaş üstü nüfus grubunda 50/100.000 'e ulaşmaktadır (18).

Diğer hematolojik malignansilerden farklı olarak KLL, iyonize radyasyon, ilaç, kimyasal maddeler, otoimmün hastalıklar ve virüsler ile ilişkilendirilememiştir (19). Ancak çiftçilerde KLL insidansının diğer mesleklere göre fazla olması bitki ve böcek öldürücülerinin olası etyolojik rolünün sorgulanmasına yol açmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda KLL' li hastalarda normal populasyonla karşılaştırıldığında artmış HCV prevelansı saptanmış ve patogeneizde rolü olabileceği düşünülmüş, bazı çalışmalarda da EBV' nin patogeneizde rol oynadığı ileri sürülmüştür (20). Çoğu KLL vakası sporadik olmakla beraber birçok ailesel KLL vakaları da bildirilmiştir (21). KLL' deki ailevi öykü diğer lösemilerden daha sıktır. Her on KLL olgusundan birinin ailesinde KLL ya da diğer lenfoproliferatif hastalıklardan birisinin olduğu belirtilmektedir. Buna paralel olarak, KLL hastalarının birinci derecedeki yakınlarında daha genç yaşlarda KLL ve diğer lenfoproliferatif hastalık gelişme riski normal populasyondan üç kat daha yüksektir. Bunların ışığında familyal KLL' li vakalarda bazı genetik faktörlerin erken lökomogeneizde rol alabileceği düşünülmektedir (22,23).

Oldukça değişken klinik seyir gösteren KLL' de tanı sonrası hastaların bir kısmı asemptomatik olup, uzun yıllar ilerleme olmaksızın yaşarken, bir kısmı da tanı anında ya da erken evrede olmasına karşın hızla ilerleme eğilimi gösterebilmektedir. En sık görülen semptomlar halsizlik, kilo kaybı, ateş, gece terlemesi gibi nonspesifik belirtilerdir. Yaşlı hastalarda sağkalım, çoğunlukla KLL dışı nedenlere bağlıdır. Oysa ileri evre ya da hızla ilerleme bulguları var olan genç hastalarda beklenen sağkalım süresi küratif tedavi yaklaşımı olmaması nedeniyle oldukça kısadır. Tanı anında ortalama yaşam süresi 1 yıl ile 10 yıldan uzun süre arasında değişkenlik göstermekle

birlikte, olguların büyük çoğunluğunda bu süre 7.5 ile 10 yıl arasında değişmektedir (24).

Tanı için periferal kandaki monoklonal B-lenfosit sayısının mm^3 'te 5000'in üzerinde olması ve bu lenfositlerin akım sitometrik olarak KLL için özgül immünofenotipik özellik taşıması gerekmektedir. Karakteristik immünofenotip, Cluster Differentiation(CD), CD5 pozitif (CD5+), CD19+, CD20 (+), CD23+, sIg (yüzey immunoglobulin) (düşük +), CD79b (düşük +) ve FMC7negatifliğidir (25,26).

Evrelemede Binet ya da modifiye Rai sistemleri kullanılmaktadır (Tablo 1) (27,28). Her iki evreleme sisteminde de hastalığın evresi, lenfadenopati ve kemik iliği (Kİ) tutulumunun varlığına göre belirlenir. İki sistemde de hastalığın evresi sağkalım süresi ile korelasyon gösterir; ileri evre hastalarda sağ kalım süresi daha kısadır. Tanı sırasında düşük evreli olan hastaların bir bölümü hızlı progresyon gösterir ve sağkalım süresi bu grupta daha kısadır, ancak evreleme sistemlerinden ikisi de bu hasta grubunu belirlemede yetersiz kalır. Hastalığın tanı anındaki evresi hastalığın seyri açısından tam bir fikir vermemektedir. Bu sebeple hastalığın prognozunu hastanın yaşı, cinsiyeti, tümörün biyolojisi ve kinetiği gibi durumlar da etkilemektedir (28-30). Ayrıca lökosit sayısı, Kİ tutulum şekli ve kemik iliğindeki lenfosit oranı, lenfosit katlanma süresi (LKS), serumdaki LDH, $\beta 2\text{M}$, ve timidin kinaz yüksekliği, sitogenetik değişiklikler, *p53* ve immünglobulin ağır zincir gen (IgVH) mutasyonu, CD 38 pozitiflik oranı, zeta-associated protein 70 (ZAP-70) pozitifliği, VEGF, CD 20, CD79d, trombopoietin, telomer uzunluğu, telomeraz aktivitesi, Mantle hücreli lenfoma (MHL) belirteç varlığı, lipoprotein lipaz A, ADAM29 (a disintegrin and metalloprotease domain) artışı, HS1 (hematopoietic lineage cell-specific protein 1) protein artışı ve CLLU1 (CLL upregulated gene 1) gen ekspresyonundaki artış da hastalığın prognozunu etkileyen faktörler arasında yer alabilmektedir (31-34).

Tablo 1. KLL’ de Klinik Evreleme Sistemleri

Rai Evrelemesi			Binet Evrelemesi	
Düşük	0	Dirençli (uzun süreli) lenfositoz	A Hb $\geq$ 10 gr/dl Trombosit $\geq$ 100.000/mm ³	< 3 lenf düğüm bölgesi
Orta	1	Evre 0 + Lenfadenomegali	B Hb $\geq$ 10 gr/dl Trombosit $\geq$ 100.000/mm ³	$\geq$ 3 lenf düğüm bölgesi
2		Evre 0+1+ splenomegali ve/veya hepatomegali		
Yüksek	3	Evre 0+2+ anemi (Hb<11 gr/dl)	C Hb<10 gr/d Trombosit <100.000/mm ³	Alan sayısı önemiyle değil
4		Evre 0+3+ trombositopeni (<100.000/mm ³)		

2.2. Küçük Lenfositik Lenfoma (SLL; Small Lymphocytic Lymphoma):

KLL WHO sınıflamasına göre SLL ile aynı hastalık olarak kabul edilir. Hastalık sadece lenf nodunu tuttuğunda SLL; kemik iliği ve periferik kanda bulgu verdiğinde ise KLL adını alır. SLL, KLL ile birçok ortak histopatolojik ve immunfenotipik özellikler taşır ama periferik kanda mutlak monoklonal lenfositoz olmaması ile KLL’ den ayrılır (24,35).

2.3. Kronik Lenfositik Lösemi’ de Prognozu Etkileyen Faktörler

2.3.1. Serolojik Belirteçler

2.3.1.1. β 2 mikroglobulin (β 2M) :

β 2M, KLL hastalarında, hastalık evresi ve tümör yüküyle ilişkili bir serum belirteçidir. β 2M düzeylerinin kemoterapi yanıtı ve toplam sağ kalım süresi ile ters ilişkili olduğu gösterilmiştir (2). Tedavi almamış 302 hastada β 2M’in çok değişkenli analizinde, 5 yıllık sağ kalım süresi üzerine güçlü belirleyici etkisi saptanmıştır. β 2M düzeyi yüksek olan Rai evre I-II hastalarda beş yıllık sağ kalım süresi 54 ay, β 2M düzeyi normal olanlarda ise 116 ay olarak bulunmuştur (10). Buna karşın herhangi bir tedavi almamış 106 hastayla yapılan bir diğer çalışmada ise, β 2M’in çok değişkenli analizde tek başına sağ kalım süresi üzerine önemli bir belirleyici etkisinin olmadığı gösterilmiştir (36). Değişik çalışmalar β 2M’nin prognostik gücünün kendisinde veya soluble CD23 (sCD23) gibi diğer prognostik faktörlerle kombinasyonunda olduğunu kanıtlamıştır (37). Ayrıca β 2M düzeylerinin sCD38 (38-40) ve ZAP70 ekspresyonu (39) ile de ilişkili olduğunu belirten çalışmalar vardır. β 2M’in, KLL’de prognostik önemi olsada bu belirtecin hastalığın evresi ve

LKS' inden bağımsız olduğunu gösterecek ve erken evre KLL hastalarındaki rolünü tanımlayacak ek çalışmalara ihtiyaç vardır(10).

2.3.1.2. Serum timidin kinaz (TK) aktivitesi:

TK, DNA sentezinde rol alan hücresel bir enzimdir (10). Predominant izoformu bölünebilen hücrelerde varken, istirahat evresindeki hücrelerde yoktur. Bu nedenle muhtemelen neoplastik hücrelerin bölünme sayısı ile ilişkilidir ve serum TK (sTK) hücre proliferasyon belirteci olarak kullanılabilir (41). Tümör kitlesinin büyümesini ve tümör hücrelerinin çoğalma derecesini yansıttığı düşünülmektedir (32). sTK düzeyinin yükselmesi, ilerlemiş Rai evre ve progresif hastalıkla ilişkili olduğu için erken evre KLL hastalarında, prognozun değerlendirilmesinde sTK düzeyinin yararlı olduğu belirlenmiştir (41). sTK aktivitesi sağ kalım süresi ile ters ilişkili olup, rutin laboratuvarlarda çalışılmaması, klinikte kullanımını sınırlamaktadır.

2.3.1.3. Serum LDH düzeyi:

LDH, farklı genlerden kodlanan, 5 tetramerik izoenzimden oluşmaktadır (42). Serum LDH düzeyinin, hematopoietik malignite veya diğer neoplastik bozukluğu olan hastalarda yükseldiği görülmüştür. Bu nedenle tümör agresifliğinde veya yüksek tümör yükünün tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır (43). LDH yüksekliğinin hücre çoğalmasını yansıttığı düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, KLL hücrelerindeki LDH aktivitesinin, normal B hücrelerine göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (42). 190 KLL' li hastada yapılan çalışmada yüksek LDH ile toplam sağ kalım süresi ve tedavisiz izlem süresi arasında ters bir ilişki saptanmıştır (44). Dolayısıyla, KLL hastalarında yüksek LDH düzeylerinin CD38 ve ZAP70 ekspresyonundaki artışlarda da olduğu gibi, kısa yaşam süresiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (37).

2.3.1.4. Serum sCD23 düzeyi:

Değişik membran proteinleri plazmaya salınabilmekte ve bu soluble CD moleküllerinin düzeyleri KLL' de tümör belirteci olarak kullanılabilir. CD23, KLL hücrelerinde yüzey molekülü olup, serum sCD23 düzeyi KLL hastalarında prognoz belirleyicisidir. sCD23'ün serumda yüksek seviyede bulunması, kötü prognozun göstergesi olarak değerlendirilebilir. Buna göre sCD23 düzeyi, toplam sağ kalım süresi ve Binet evre A hastalarında hastalık ilerlemesiyle ters ilişkilidir (45). Ancak yüksek sCD23 düzeyleri, diffuz kemik iliği infiltrasyon paterni, kısa LKS, sTK düzeylerinin ve CD38 ekspresyonunun yükselmesi ve kemik iliğinde yüksek ZAP70 ekspresyonu ile ilişkilidir (46). Bununla birlikte bağımsız prognostik önemi kanıtlanmamıştır (32).

2.3.1.5. CD38 Ekspresyonu:

CD38, 45 kDa ağırlığında hem enzim hem de reseptör görevi gören bir transmembran glikoproteini olup, CD38' i kodlayan gen 4 numaralı kromozomun p15 bölgesinde bulunmaktadır (47). 1980 yılında T hücre farklılaşma antijeni olarak tanımlanmıştır. Takip eden yıllarda birkaç çalışmada CD38 ekspresyonunun, T hücreleri ile sınırlı olmadığı ve farklı hematopoietik ve nonhematopoietik dokularda da büyük oranda eksprese edildiği gösterilmiştir (48,49). Damle ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada CD38 pozitifliğinin daha fazla kemoterapi ihtiyacı ve daha kısa yaşam süresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (47). CD38 ekspresyonu ile LKS, serum sCD23 (40) ve LDH düzeyleri (38), kemik iliği histolojisi (50), kötü prognozu gösteren genetik değişiklikler, bulky lenfadenopati (40) ve β 2-Mikroglobulin düzeyleri (38,40) gibi diğer prognostik faktörler arasında anlamlı ilişkiler tanımlanmıştır.

Hematopoietik hücrelerde CD38 ekspresyonu, bu hücrelerin olgunlaşma ve aktivasyon evreleriyle ilişkilidir. CD38, normal germinal merkez lenfositlerinin yüzeyinde eksprese edilir. CD38' in ligasyonu normal B hücre lenfosit oluşumunu aktive etmektedir. Yani CD38 sinyali aracılığıyla germinal merkez B hücrelerinin apoptoza gitmesi önlenmektedir. Bu bulgu, CD 38 ekspresyon düzeyinin B hücre klonunun toplam sağ kalımını doğrudan etkilediğini göstermektedir (51).

CD 38'in, CD 34 pozitif hücrelerde, uyarılmamış pregerminal merkez B hücrelerde, germinal merkez B hücrelerde, aktive olgun lenfositlerde, myeloid prekürsörlerde, periferik kan doğal öldürücü (Naturel Killer (NK)) hücrelerde, aktive olmuş T ve B lenfositlerde ve de plazma hücrelerinde eksprese olduğu belirtilmektedir (51).

CD 38 antijeninin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, erken differansiyasyon aşamalarında apoptozu engellenmiş lösemik hücrelerde pozitif olarak saptanırken, daha geç differansiyasyon aşamalarındaki lösemik hücrelerde ise ekspresyonu saptanamamıştır (51).

KLL' li olgularda CD38 ekspresyonu farklıdır ve prognostik değeri vardır (47,51). CD 38 ekspresyonuna göre KLL hastaları iki gruba ayrılmaktadır. CD38 ekspresyonunun yüksek olması (CD 38⁺), ileri evre hastalık ve kemoterapiye kötü yanıtla ilişkilidir (49). CD38⁺ hastalarda, neoplastik hücrelerinde atipik morfoloji, yaygın kemik iliği infiltrasyonu ve periferik lenfosit sayısında yükseklik görülür. Schroers ve arkadaşlarının çalışmasında, CD38⁺ hastalarda tedaviye başlama oranını %67, CD38⁻ hastalarda ise %35 olarak bulmuştur (39). Ancak, Crespo ve arkadaşlarının çalışmalarında, CD38 pozitifliğinin sağ kalım ve progresyonu belirlemede tek başına yetersiz olduğu ileri sürülmüştür (52).

CD 38 ekspresyonu KLL olgularında kötü prognozün göstergesi olmakla birlikte, CD 38 ekspresyonunun eşik değeri tartışma konusudur (51,2). Bazı çalışmalarda CD 38 ekspresyonu pozitif ve negatif hastaları sınıflamak için %30 cut-off değeri seçilmiştir (53). Sonraki çalışmalarda % 7 (47), % 5 (54) gibi eşik değerlerinin de prognozda önemli olduğunun bildirilmesiyle optimal cut-off değeri tartışmalı hale gelmiştir.

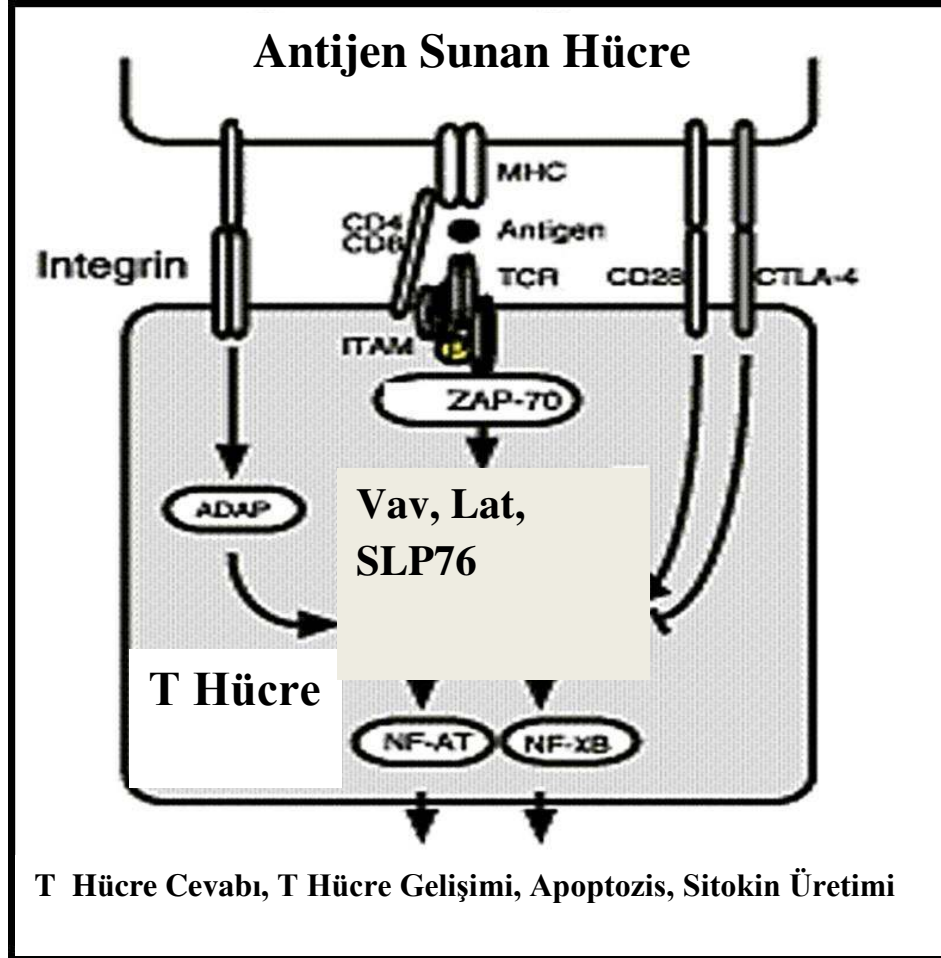
CD 38' in hastalığın erken evresinde, ileriye dönük olarak hastalık seyri üzerinde faydalı bir prognostik marker olarak fikir vermesiyle birlikte, hastalık progresyonu ya da eklenen bir enfeksiyon tablosunun CD 38 ekspresyon düzeyini arttırabilmesi, CD 38 pozitiflik oranının dezavantajlarını oluşturmaktadır (51-55).

2.3.1.6. ZAP-70 Ekspresyonu

ZAP-70, T hücre aktivasyonunun erken aşamalarında önem taşıyan sitoplazmik, 70 kDa ağırlığında Syk-ZAP-70 tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir (56,57). ZAP-70' i kodlayan gen 2 numaralı kromozomda q11.2 bölgesinde bulunmaktadır. T hücre reseptöründen sinyal iletimiyle ilişkilidir (58). 619 aminoasit uzunluğundaki 3 zincirden oluşur. Tirozin kinaz aktivitesi gösteren kısım, SH (Src Homology) adında 3 ana domain içerir. SH1 bölgesi enzimatik aktivite içerir, SH2 domaini özellikle protein-protein etkileşimini ve özgün olarak fosfotirozinleri tanıyarak fosforilasyonu kontrol eder ve SH3 domaini ise, protein etkileşimleri için daha özgün tanınmalarını sağlar. ZAP-70' in N terminalinin sonunda iki SH2 bölgesi, karboksi terminalindeyse katalitik bölgeler bulunur. ZAP-70'in SH2 bölgesi, Syk immün reseptörler üzerinde bulunan ITAM olarak adlandırılan immünreseptör tirozin tabanlı aktivasyon motiflerini özgün olarak tanır (27).

T hücre reseptör (THR); ζ zincirinin sitoplazmik kuyruğundaki fosforillenmiş tirozinlere bağlanmakta ve böylece sinyal kaskadının diğer komponentlerinde rol alan adaptör proteinleri fosforile etmektedir. THR 'nin antijen ile birleşmesi sonucu sinyal ileti sistemi aktive olur. T hücre aktivasyonunun ilk aşamasında, Src ailesine ait bir protein tirozin kinaz olan, Lck aktiflenir. Aktiflenen Lck, THR kompleksinin alt üniteleri CD3 ve ζ içerisinde yer alan ITAM' ı fosforiller. Src ile fosforillenmiş ITAM motifleri, ZAP-70 ve Syk ile ilişkiye girerek bunları aktifler. Aktive olan ZAP-70 ve Syk kinazlar sinyal iletimini sağlayacak olan Vav, Lat, SLP76 gibi proteinleri fosforilleyerek T hücre çoğalması, T hücre reseptör stimülasyonuna yanıt olarak sinyal kaskadını başlatma, sitokin salınımı ve T hücre olgunlaşmasında rol oynarlar (56-60).

T hücre aktivasyonu ve aktivasyonda ZAP-70'in rolü şematik olarak aşağıdaki gibidir (Şekil 1) (46):



Şekil 1. T Hücre Aktivasyonunda ZAP-70' in rolü

Periferal kanda, NK ve T hücrelerinde ZAP-70 yüksek oranda eksprese edilirken, B hücrelerinde ekspresyonu yoktur (58,61,62). Yapılan çalışmalarda aktive tonsil ve dalak B hücreleri ve kemik iliği pro-B hücreleri gibi B hücre alt gruplarında, ZAP-70 ekspresyonunun olduğu gösterilmiştir (60,63).

NK hücrelerdeki ZAP-70, CD16 kompleksinde bulunan ζ alt ünitesi ile reaksiyona girerek NK aktivasyonunda rol oynar (64).

ZAP70 ve Syk proteinleri aynı protein tirozin kinaz ailesindendir ve membran antijen-reseptör sinyal yoluna benzer rol oynarlar. Sağlıklı B hücrelerinde ZAP-70 ekspresyonu yoktur. Bu hücrelerde Syk protein ekspresyonu bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar Syk eksikliği olan KLL hücrelerinde bu görevi ZAP-70'in üstlendiğini işaret etmişlerdir (65,66).

Chen ve arkadaşları, ZAP-70 ekspresyonunun, KLL hücrelerinde B hücre reseptör kompleksi (BCR) aracılı sinyal iletimini artırdığını ileri sürmüşlerdir (65).

İntraselüler BCR sinyalinin artması KLL hücrelerinde sağkalımı ve çoğalmayı etkileyebilir (67).

KLL hücrelerinde saptanan ZAP70 düzeyi ile son dönemde yapılan araştırmalar IgVH mutasyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir (59). Mutasyonsuz IgVH gen ekspresyonu olan KLL hücreleri ZAP-70 RNA eksprese ederler. Carreras ve arkadaşlarının 52 KLL olgusunda yaptıkları incelemede 1'i hariç tüm ZAP-70 pozitif KLL olgularında IgVH geninde mutasyon olmadığı ve buna karşın yine 1'i hariç tüm ZAP-70 negatif olgularda IgVH geninde mutasyon olduğu saptanmıştır (59). IgVH ve ZAP70 arasındaki ilişkiyi gösteren 167 olguluk bir başka çalışmada mutasyon saptanan 108 olguda ZAP70 (-) iken mutasyonsuz 46 olguda ZAP70 (+) bulunmuştur. 13 olguda çelişki bulunmuştur. Ortalama yaşam süresi ZAP70 (-) olgularda 24.4 yıl iken, (+) olgularda 9.3 yıl bulunmuştur.(68).

KLL olgularında prognostik bir faktör olan IgVH mutasyon durumu ile ZAP-70 ilişkisinin gösterilmesinden sonra, ZAP-70' in sağkalım süresini ve progresyonu belirlemekte de önemli olacağı öne sürülmüştür (52). Özellikle erken evre KLL' de ZAP70 pozitifliği olan hastalarda, hastalığın agresif bir seyir izlediği ve bu hastalarda tedavisiz sürecin kısa, tedavi ihtiyacının yüksek, sağ kalımın düşük olduğu bildirilmektedir. Tanı sırasında ZAP-70 düzeyinin belirlenmesinin erken dönemde hastalık progresyonunun değerlendirilmesinde önemli bir parametre olduğu ileri sürülmüştür (52,69).

2.3.2. İmmunfenotipik Analiz

KLL' li olguların periferik yaymasında, çok az sitoplazması olan, oval nükleuslu homojen, klonal olarak çoğalan olgun görünümlü küçük lenfositler izlenir. Nükleus yoğun kromatinli olup çoğunlukla nükleolusu yoktur. Hücre membranları oldukça fragildir ve sıklıkla preparatın hazırlanma aşamasında lösemik hücreler yırtılırlar (70).

Olguların %95'inden fazlası B lenfosit karakteri taşırlar. B lenfositlerinin yüzeylerinde ise, CD5, CD19, CD20, CD23, CD22/CD79 eksprese olur. CD22 ekspresyonu daha zayıftır. Tipik olarak düşük derecede yüzey immünglobulini taşırlar (sıklıkla IgM ve/veya IgD ve düşük oranda IgG ya da IgA). Lösemik hücreler monoklonal olduğu için kappa ya da lambda hafif zincirlerinden sadece birini eksprese ederler (2). KLL lenfosit immünfenotipleme Tablo2' de gösterilmiştir (71).

Tablo 2. KLL İmmüfenotiplemesi

Çoğunlukla Pozitif	Nadiren Pozitif	Çoğunlukla Negatif
CD5	C11c	CD10
CD19	CD25	Cyclin D1
CD20	CD27,CD38	CD79b
CD23	CD40, CD54, CD58	CD22
sIgM	CD69	CD32
CD79a	CD71, CD62	sIgD

Serum belirteçlerinin bir kısmı LDH, β 2-Mikroglobulin, soluble CD23, CD27, ve CD44 (sCD23,sCD27, sCD44), plazmada dolaşan CD20 (cCD20), interleokiner ve trombopoietin hastalık yükünü ve hücresel aktiviteyi yansıtabilir. Genelde CD19 ve CD20 pozitifliği, lenfositlerin B hücresi olduğunu göstermektedir. Eğer lenfositler CD5 eksprese ediyorsa; KLL veya Mantle Hücreli Lenfoma (MHL) olma olasılığı çok yükselmektedir. KLL hücrelerinde genelde CD23 pozitifdir ve MHL'da CD23 negatif olduğu için doğru tanıya varmak mümkündür. Fakat bazı istisna KLL olgularında (%10) CD23 negatif veya tersine MHL da CD23 pozitif olduğu görülmüştür (72). Bu olgularda FMC7' nin negatif olması durumunda KLL tanısı desteklenmektedir. Fakat MHL tanısını tamamiyle ekarte etmek için immünohistokimyasal olarak cyclin-D1 boyama sonucu önem kazanmaktadır (73). Ayrıca sitogenetik veya FISH tekniği ile t(11;14) translokasyonunun belirlenmesi ayırıcı tanıda çok önemlidir. Eğer lenfositlerde t(11;14) translokasyonu gözlenirse, tanı MHL olarak yorumlanır (74).

WHO sınıflandırmasına göre eğer histolojik olarak plazmositik görünüşü olan lösemik hücreler CD5 ve CD20 açısından pozitif ise, otomatik olarak KLL-lenfoplazmositik diye isimlendirilmesi önerilmiştir (75).

2.3.3. Sitokinler

KLL hücresi, hücre siklusunun G₀ fazında kalmış, bölünmeyen monoklonal neoplastik CD5+ B hücre kökenlidir. Malign hücreler kemik iliği, lenf nodları, dalak ve periferik kanda yavaş fakat ilerleyici tarzda birikir. Lösemik hücrelerin birikiminde, hücre proliferasyonundan çok, programlı hücre ölümünün yerine getirilememesi rol oynamaktadır. Hastalığın ileri aşamalarına hipogammaglobülinemi nedeniyle oluşan enfeksiyonlar, hücresel immün defektlere bağlı otoimmün hastalıklar veya ikincil neoplaziler eşlik eder (3,4).

KLL' de ya hücreye dışardan sitokinlerin etkisiyle ya da intrinsik olarak lösemi hücresinde antiapoptotik mekanizmaların aktivitesi ile apoptozun engellendiği düşünülmektedir (76).

KLL hücreleri çeşitli sitokinlerini salgılayabilecek yetenektedir. Bazı sitokinler lösemik hücrelerin yaşamasına destek olmaktadır. Bu hücrelerin interlökin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, interferon (IFN)- γ , tümör nekrozis faktör (TNF)- α , granulosit-makrofaj koloni stimule edici faktör (GM-CSF) ve transforme edici büyüme faktörü (TGF)- β salgıladıkları saptanmıştır (77).

TNF- α , CD40, IL2, IL7, ve IL15'in KLL hücrelerinin çoğalmasını desteklediği ve IL4, IL6, IL8, IL10, IL13, TGF- β , INF- β ve FGF' in ise apoptozisi engellediği gösterilmiştir (78). Bunun yanı sıra bazı faktörlerin de hem proliferatif hem de antiapoptotik etkileri belirlenmiştir. Bazı araştırmacılar, INF- α ' nın *in vitro* olarak bazı KLL hastalarından alınmış hücrelerde proliferasyonu durdurduğu, diğer bir grupta ise INF- α ' nın KLL' deki apoptozu durdurduğu belirtilmektedir (79,80). KLL hücresinde salgılanan sitokinler ve T hücresinin sitokin stoğu, KLL hücresinin gelişimi ve yaşam süresini etkilemektedir (77).

Sitokinlerin hücre içine gönderdiği sinyal, doğal olarak intrinsik sinyal sistemini aktive etmektedir. Bu sinyal sistemi değişik protein kinazları, özellikle, fosfotidilinozitol-3 (IP-3) kinaz ve protein kinaz C' i aktive etmektedirler (81,82). Bu sinyallerin aktive olmasıyla KLL hücrelerinin yaşamasını destekleyen transkripsiyon faktörleri aktive olur. Bu transkripsiyon faktörleri arasında NF κ B diye bilinen proteinin, KLL hücrelerinin yaşaması için çok gerekli olduğu birçok yayında gösterilmiştir (82,83).

KLL' nin ileri aşamalarında immün sistem hücre fonksiyonlarındaki yetersizlik, hücrenin sitokin ağını değiştirerek ikincil neoplazi, otoimmün hastalıklar veya enfeksiyon nedeni olabilmektedir. KLL hücreleri ve T hücreleri arasındaki bilgi ağı değişince lösemik B hücreleri kontrolsüz çoğalabilmektedir. Yeni oluşan sitokin ağı, KLL hastalarında hücre proliferasyonunu arttırırken, apoptozu inhibe edebilmektedir. KLL hücrelerinin *in vitro* koşullarda hızla ölmesi ancak, *in vivo* koşullarda uzun yaşam süresi bunu kanıtlar niteliktedir. Yapılan çalışmalar, *in vitro* koşullarda IL-2 ve TNF- α 'nın lösemik hücrelerin proliferasyonunu; IL- 4'ün hücre canlılığını arttırdığını göstermiş, IL-5' in hücreleri apoptoza götürdüğünü belirlemiştir. (77).

KLL hastalarında T ve B hücreleri tarafından sentezlenen IFN- γ düzeyindeki artış TNF- α üretimini arttırmakla beraber, KLL hücresinin sayıca çoğalması ve uzun süre hayatta kalmasına neden olmaktadır (77).

2.3.4. Kemik İliği İnfiltrasyon Tipi- Lenfosit Katlanma Süresi

KLL’ de interstisyel, nodüler, kombinasyonel (interstisyel ve nodüler) ve diffüz olmak üzere 4 farklı kemik iliği infiltrasyon tipi tanımlanmıştır (84-86). Nodüler tip; bazı alanlarda normal hematopoetik hücrelerin yerini nodüler lenfosit infiltratlar almasına karşın kemik iliğinin normal yapısı korunmuştur. İnterstisyel tip; lenfositik infiltratlar, hematopoetik hücreler ve yağ alanlarının arasında dağılmıştır. Kemik iliği yapısı korunmuştur. Karışık tip; nodüler ve interstisyel tipin birlikteliğidir. Diffüz tip; yaygın lenfosit infiltrasyonu normal kemik iliği yapısını bozmuştur (87). Diffüz tutulum kötü prognozu göstermekle birlikte, bazı araştırmacılar bunun ek bir üstünlüğü olmadığını ileri sürmektedir (2,86).

LKS, mutlak lenfosit sayısının ikiye katlanma zamanının ay olarak belirlenmesiyle hesaplanır (10). Çoğalma hızını, basit metotla ölçen yararlı bir prognostik belirteçtir (88). Bir çalışmada LKS, 12 ay ya da daha kısa olan hastaların sağ kalım süreleri 61 ayken, LKS 12 aydan daha uzun olan hastaların ortalama takip süreleri 118 ay olarak belirlenebilmiştir. Bu çalışma, LKS’ nin bağımsız prognostik önemini göstermiştir (89). Ancak LKS geriye dönük olarak hesaplanır ve zamanla ilgili değişikliklerden tümüyle etkilenebilir (10). Enfeksiyonlar ya da kortikosteroid tedavisiyle lenfosit sayısının değişmesi, LKS’ nin kullanımında güçlük yaratmaktadır (54). Tedavi kararında LKS’ nin temel alınması hızlı seyirli kimi hastalarda tedavinin gecikmesine yol açabilmektedir (41).

2.3.5. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF)

VEGF, tümör anjiogenezinde önemli bir araçtır (10). VEGF; vasküler endotel hücreleri için etkili bir mitojendir, ancak diğer hücre tipleri için mitojenik aktivitesi yoktur (90). VEGF yeni damar oluşumu sırasında kemik iliği kökenli endotel hücre öncüllerinin mobilizasyonunda da önemli rol oynar (91). Arteriyel ve venöz sistemde yeni damar oluşumu sırasında, VEGF, endotel hücrelerinin apoptozunun inhibisyonu ile yaşam sürelerinin artmasına, proliferasyonuna ve migrasyonuna neden olarak direkt olarak anjiogenezde etkilidir (91).

Birçok çalışmada KLL’ de görüldüğü gibi, akut myeloid lösemi (AML), akut lenfoid lösemi (ALL), non hodgkin lenfoma (NHL), multilpl myelom (MM), myelodisplastik sendrom (MDS) ve kronik myeloid lösemi (KML) gibi diğer hematolojik kanserlerde de artmış anjiogenez ve bununla ilişkili olarak artmış VEGF düzeyleri tespit edilmiştir (92). Aguayo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada KLL, AML, KML ve MDS’ de plazma VEGF düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (93).

Bazı çalışmalarda KLL patogenezinde anjiogenezin rol oynadığı gösterilmiştir (94,95). Molica ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yeni tanı almış Binet A evresindeki 45 KLL’ li hastanın kemik iliğinde damar alanı genişliği kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada damar alanı genişliği daha yüksek olan hastalarda hastalık progresyonu daha kısa sürede gerçekleşmiştir (96).

KLL’ de lösemik hücrelerde Western blot ve Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemleri hücre içi VEGF- mRNA ve kemik iliğinde de VEGF antikolları kullanılarak yapılan boyama yöntemiyle VEGF düzeyleri tespit

edilebilmektedir (96,97). 2000 yılında yayınlanan bir çalışmada 11 KLL hastasında; akım sitometrisi ile VEGF' nin 165 kDa ve 121 kDa izoformuna yönelik monoklonal antikorlar kullanılarak inceleme yapılmıştır. Tüm hastaların lösemik hücrelerinde VEGF' ye karşı pozitif reaksiyon saptanmıştır (98).

Ancak VEGF düzeylerinin bu şekilde tayini ileri laboratuvar teknikleri gerektirdiğinden günlük pratikte kullanışlı bir yöntem olarak görünmemektedir. Buna karşın serum VEGF düzeyleri ELISA yöntemiyle kolaylıkla tayin edilmektedir. 2005 yılında yayınlanan bir çalışmada daha önce tedavi almamış farklı Rai evrelerindeki 83 KLL hastasının serum VEGF düzeyi sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada ileri evredeki KLL hastalarının serum VEGF düzeylerinin erken evre hastalara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir ($p < 0,0001$) (99). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda erken evre KLL' de yüksek serum VEGF düzeylerine sahip olgularda hastalık progresyonunun daha kısa sürede gerçekleştiği bildirilmiştir (96,100).

2.3.6. Genetik Abnormaliteler

KLL' de konvansiyonel sitogenetik yöntemlerle kromozom elde edilmesi, neoplastik hücrelerde düşük mitotik indeksin olması ve metafaz kalitesinin de kötü olması nedeniyle oldukça zordur (32,101). FISH, metafaz ve interfaz hücrelerinin her ikisinde de özgün kromozomal anormallikleri saptamaya olanak sağlar (14). Günümüzde Comparative Genomic Hybridization (CGH) ile analiz sonucu yığılım gösteren çoğunluğu delesyon bölgelerine ilişkin panel problemler geliştirilmiştir. Konvansiyonel sitogenetik çalışmalar ile KLL hastalarının % 30-40' ında sitogenetik anormallikler gösterilirken, kromozomlara özgü farklı problemler kullanılarak yapılan FISH analizleri ile bu oran %80' lere çıkmıştır (14). Bu problemler kromozom 13' ün uzun kol delesyonlarını, kromozom 11' in uzun kol delesyonlarını, kromozom 17' nin kısa kol delesyonlarını ve trizomi 12' yi belirlemeye olanak sağlar, bunun dışında *IGH* (14q32), *BCL6* (3q27) ve kromozom 6 yeniden düzenlenmelerini belirlemede de FISH yöntemi kullanılabilmektedir (54,142,143). Konvansiyonel sitogenetik yöntemlerle en sık trizomi 12, 13q14 ve 14q32 kromozomal anormallikleri saptanırken, FISH yöntemi ile en sık 13q14 delesyonu (%40-60), trizomi 12 (%15-30), 11q22.3 delesyonu (%15-20), 17p13 delesyonu (~%10) ve 6q23 delesyonu (~%7,5) saptanabilmektedir. Bu sitogenetik belirteçlerin özellikleri Tablo 3' de özetlenmiştir (101,102).

Tablo 3. KLL' de en sık gözlenen sitogenetik belirteçler

Kromozomal Aberasyon	Frekans (%)	Ortalama yaşamsür esi (ay)	Tedavisiz ortalama yaşam süresi(ay)	Gen içeriği	Özellik
17p13	10	32	9	<i>p53</i>	Kemoterapiye direnç
11q22.3	15-20	79	13	<i>ATM</i>	Yaygın LAP
trizomi 12	15-30	114	33	<i>MDM2</i>	<i>p53</i> ' ün negatif regülatörü
13q14	40-60	133	92	<i>miR15a</i> ve <i>miR16-1</i>	İyi prognoz

Bu kromozomal abnormaliteler ve klinik bulgular arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde 17p ve 11q delesyonunda sağ kalım süresinin kısa olduğu, tek başına 13q delesyonunun varlığında ise sağ kalım süresinin uzadığı belirlenmiştir (101).

2.3.6.1. *P53* tümör baskılayıcı gen ve *MDM2*

17p13 lokusunun delesyonu, KLL olgularında % 7-12 oranında görülür (101,103). 17p13 bölgesinde bulunan *p53* tümör baskılayıcı gen programlı hücre ölümünün düzenlenmesinde anahtar moleküldür (103,104). *p53* apoptozun indüklenmesinde veya DNA hasarından sonra hücre siklusunun durdurulmasında önemli bir rol almaktadır. KLL' de, 17p13 kromozom bölgesinin delesyonu kötü prognoz ile ilişkilidir. 17p13 bölgesinde delesyon olan veya *p53* gen mutasyonu saptanmış KLL hastaları *p53* bağımlı apoptoz temelinde uygulanan pürin nukleozid analogları (örneğin Fludarabin) ve alkileyici ajanlar (örneğin Klorambusil) ile yapılan kemoterapiye dirençlidir (47,101,105). Aynı zamanda 17p delesyonu kısa tedavisiz izlem süresiyle de ilişkili olduğundan 17p delesyonu belirlenen bu hastalarda ortalama sağ kalım süresi 32 aydır (14,101).

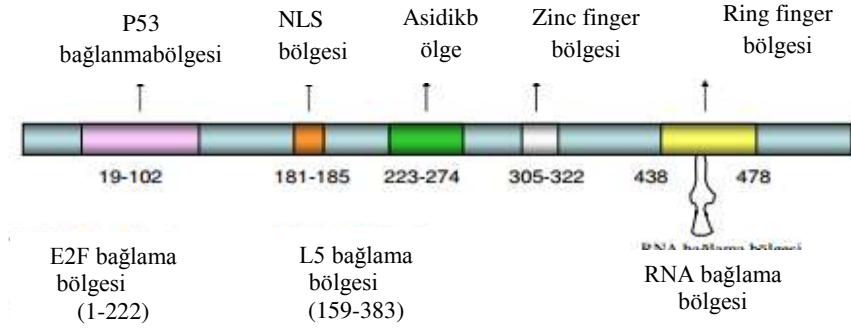
Bir tümör supresör gen olan *p53* geni 17 numaralı kromozomun kısa kolunda lokalize olup (17p13.1), 11 ekzon ve 10 introna sahiptir. Bu genin ürünü 393 aminoasitten oluşan 53 kDa 'luk bir nüklear proteindir. P53 proteini (TP53) bir transkripsiyon faktörü olarak DNA'ya bağlanma, hücre döngüsünün düzenlenmesi, DNA tamiri, farklılaşma, genomik plastisite ve apoptoz gibi birçok farklı fonksiyona sahiptir. Bu çok kapsamlı fonksiyonlarından dolayı *p53* geni kanser biyolojisi alanında en fazla çalışılan tümör supresör genlerinden birisi olmuştur. Normal şartlarda *p53* proteini hücre içinde inaktif halde, düşük yoğunlukta ve kısa yarı ömürlü olarak bulunmaktadır. DNA hasarı, hipoksi, nükleotid havuzunda azalma,

viral enfeksiyonlar ve onkogen aktivasyonu gibi çeşitli genomik stres durumlarında p53' ün hücre içi yoğunluğu artmakta ve üç boyutlu yapısı değişerek aktive olmaktadır (18,23,106).

p53' ün stabilizasyonunun düzenlenmesinde MDM2 (MIM 164785, MDM2 veya HDM2) adlı bir protein rol oynamaktadır. MDM2, p53' ün amino ucuna bağlanarak hem onun transkripsiyonel etkinliğini baskılamakta, hem de proteozomal komplekslere yönlendirerek burada degradasyonunu sağlayan ubiquitin ligaz aktivitesi göstermektedir (107). İlginç olarak; p53, MDM2 geninin de transkripsiyonunu aktive etmektedir (108). Hipoksi, ultraviyole, radyasyon gibi hücrenin strese maruz kaldığı durumlarda MDM2' nin p53' e bağlanma yerinde asetilasyon ve fosforilasyon nedeniyle yapısal değişiklikler oluşur. Bu yüzden MDM2 proteini p53' ü bağlayamaz ve serbest kalan p53 transkripsiyonel aktivitesini göstererek G₁ ve G₂ kontrol noktalarında hücre siklusunun durdurulmasına ve BAX geni aktivasyonu ile apoptoza neden olur (109). Ancak özellikle onkojenik stimulus varlığında MDM2 etkisini, p53' e bağımlı olmayan yolla gösterir. MDM2, hücre döngüsünün G₁/S geçişinden sorumlu olan E2F (Hücre döngüsünde S evresi genlerinin transkripsiyonunu sağlar) aktivasyonunu, p14ARF' nin (MDM2' ya bağlanarak p53' ün aktivasyonuna katkı sağlayan tümör supresör gen) inaktivasyonunu yapar. İnaktive olan p14ARF hücre çekirdeğinde MDM2' yi bağlayamaz ve sitoplazmaya çıkmasına engel olamaz. Sitoplazmaya çıkan MDM2 p53' e bağlanarak onun aktivitesini inhibe eder (110).

MDM2 geni ilk olarak kendiliğinden transforme olmuş fare hücre hatlarındaki “double minute” (sentromeri olmayan küçük kromatin parçacıkları) kromozomlarından elde edilmiştir. 1–2 megabaz (Mb) büyüklüğündeki bu yapılar üç adet gen içermektedir. Bu genlerden ikincisine MDM2 adı verilmiştir (111). MDM2 geni, fare hücrelerine aktarıldığında tümör oluşumuna neden olduğundan 1991 yılında bir onkogen olarak tanımlanmıştır. Daha sonra yürütülen çalışmalarda, p53 tümör supresör proteini ile kompleks oluşturabilen 90 kilodalton (kD) büyüklüğünde bir protein gözlenmiştir. Bu proteinin dizisi çıkarıldığında, MDM2 geninin ürünü olduğu anlaşılmıştır (112).

MDM2 proteini ortalama 491 amino asitten oluşmaktadır. MDM2 proteininin 19-102 amino asitleri arasında yer alan bölge p53 bağlanma bölgesidir. Bu bölge, MDM2' nin, p53 proteininin transkripsiyonunu aktive etme görevini etkisiz hale getirmesi için gereklidir (113). 181-185 amino asitleri arasında yer alan “çekirdeğe yerleşme dizisi” ni içeren (NLS: Nükleer LokalizasyonSinyali) bölgesi, MDM2' nin çekirdek ve sitoplazma arasında aracılık etmesi için gereklidir. 221-272 amino asitleri arasında yerleşmiş olan bölge ise, glutamik asit ve aspartik asit rezidüleri içeren “asidik” bölgedir. Bu bölge MDM2' nin ribozomal protein L5 ve 5S ribozomal RNA (rRNA) ile etkileşimde bulunmasına aracılık eder (114). Bu asidik bölgeyi 305-322 amino asitleri arasında yer alan “zinc finger” bölgesi takip eder. MDM2 proteininin son korunmuş bölgesi, karboksil ucunda 438-478 amino asitleri arasında yer alan “ring finger” bölgesidir. Bu bölge ise iki adet “zinc finger” yapısı içermekte ve spesifik RNA dizilerine bağlanmasını sağlamaktadır (Şekil 2) (115).



Şekil 2. *MDM2* protein yapısı

İnsan *MDM2* geni kromozom 12q13-14'de lokalize olup, genomik boyutu 34 kb'dır. Bu genin iki promotörü bulunmaktadır. Birinci promotor 5' ucundan birinci ekzona kadardır ve stres durumunda olmayan hücrelerde, hücre içinde bulunması gereken minimum *MDM2* düzeyini sağlar. İkinci promotor bölgesi birinci intronun içindedir ve bu bölge *p53*'ün bağlandığı özgül DNA dizisi içerir. Her iki promotor da guanin (G) ve sitozin (C) nükleotitleri sayısı bakımından zengindir ve G ve C'den zengin promotor' larda gözlenen çoklu başlama bölgeleri her iki promotor' da da bulunmaktadır (116).

İnsanda *MDM2* geninin birinci intronu 524 nükleotitten oluşmaktadır. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP) bu sekans içinde iki pozisyonda bulunmuştur. Birincisi 309. nükleotid olan T (timin)' in yerine G (guanin) geçmesi, ikincisi ise 344. nükleotid olan T (Timin)' in A (Adenin)'ne dönüşümü biçimindedir. 309. pozisyonundaki SNP' nin bulunduğu bölge *MDM2* ekspresyonunu arttıran transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi olarak tanımlanmakta ve bu pozisyonundaki T (timin)' in G (guanin)' e değişimi transkripsiyon faktörüne olan afiniteyi arttırmaktadır. Transkripsiyon faktörü SNP309' a (G/G) daha güçlü bir şekilde bağlandığı için *MDM2* ekspresyonu artar ve buna bağlı olarak da *p53* aktivitesi inhibe olur. Bu nedenle, bazı KLL hücrelerinde de gözlenebilen, SNP 309 G/G genotipine sahip ve dolayısıyla yüksek düzeyde *MDM2* içeren hücreler apoptoza dirençli ve ayrıca DNA hasarında *p53* tarafından transkripsiyonu düzenlenen genlerin mRNA düzeyleri oldukça düşüktür. Bu duruma bağlı olarak, stres altındaki hücrelerden SNP309 G/G genotipinde olanların yüksek bir yüzdesinin, hem apoptozdan kaçacağı hem de hastalığın ileri evre hastalık özelliği kazanmasını sağlayacağı belirtilmektedir (117-119).

MDM2 geninin KLL' li olguların %47' sinde overekspresyonu saptanmıştır (122). KLL' li hastalarda bu genin *p53*' ü bloke ettiği gösterilmiş ve bu yolla programlanmış hücre ölümünü engelleyip, ilaç direnci oluşturduğu savunulmuştur (11). *MDM2-p53* ilişkisinden yola çıkarak KLL tedavisine yönelik yapılan son çalışmalarda, *P53-MDM2* bağlantısını engelleyerek *p53*' e aktivasyon kazandıran 'nutlins' içeren ilaçlar geliştirilmeye başlanmıştır (120,121). Ancak hastalığın evresi, agresif davranışı ile ilaç direnci arasında tam bir ilişki bulunamamıştır (122,123).

2.3.6.2. 11q22.3 delesyonu

Kromozom 11'in uzun kolunda bulunan q22-23 bölgesinin delesyonu, tüm KLL hastalarının % 12-21' inde rapor edilmiştir (103). 11q delesyonlu hastalar genel olarak daha gençtirler ve Rai evrelendirilmesine göre daha ileri evrededirler. Prognozu kötü olan bu delesyon bölgesi, Ataxi Telenjipektazi Mutasyon (*ATM*) genini içermektedir. Bu genin, nörolojik hastalıklar ve tümör oluşum riskinin artması ile karakterize kalıtsal bir sendrom olan ataksi telanjektaziden sorumlu olduğu bilinmektedir (103).

11q22.3 bölgesinde yer alan *ATM*' nin DNA hasarına yanıtta *p53* ile ilişkili apoptotik yolun aktivasyonunda baskın rol alarak lenfosit apoptozunda görev aldığı saptanmıştır. Kaybında da *p53* eksikliğine benzer sonuçlar görülür (103,104). *ATM*' nin apoptozis yolundaki bu sinerjistik etkisi nedeniyle bu gen delesyona uğradığında KLL dışı lenfoproliferatif hastalıkları da içeren bazı T hücre malignitelerinin sıklığının arttığı görülmüştür (103,104,124). KLL' li olguların üçte birinde *ATM* geninin mutasyonları veya delesyonları saptanırken, bu olgularda immünoglobulin değişken bölgesinin mutasyonunun olmadığı da bildirilmiştir (125). Ayrıca bu delesyonun büyük lenf bezleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. 11q delesyonunun olduğu hastalarda ortalama sağ kalım süresi ise 79 aydır (101).

2.3.6.3. Trizomi 12

Uluslararası Sitogenetik Çalışma Grubu KLL olgularında konvansiyonel sitogenetik yöntemler ile klonal kromozom abnormalitesi olarak en çok trizomi 12, 13q14 ve 14q32 bölgelerinde yeni düzenlemeler saptamışlardır. FISH çalışmalarında ise yaklaşık % 15-30 oranında trizomi 12 rapor edilmiştir (126). Trizomi 12 orta derece riskli KLL ile ilişkilidir. Prognoz açısından diğer kromozom abnormaliteleriyle birlikte giden trizomi 12, tek başına bulunan trizomi 12' den daha fazla risk taşımaktadır (101).

2.3.6.4. 13q14 delesyonu

KLL' de 13q14 delesyonu olguların % 40-65'inde rapor edilmiştir. 13q delesyonu sıklıkla q14 lokusu ile sınırlıdır. Ayrıca q14 lokusunu da içine alan büyük ara delesyonlar da gözlenmektedir. Trizomi 12' de olduğu gibi 13q delesyonu da konvansiyonel tekniklerle karşılaştırıldığında moleküler tekniklerle daha yüksek oranda tespit edilirler. Olguların yaklaşık olarak üçte birinde her iki allel delesyonu birden görülür. Sadece 13q delesyonuna sahip olgular daha iyi prognoza sahipken, başka bir sitogenetik anomalinin eşlik etmesi durumunda örneğin trizomi 12 ile birlikte bulunması halinde ise kötü bir klinik seyir beklenmektedir (31,103).

13q14 delesyonu (del(13q14)) retinoblastom gen inaktivasyonu ile ilişkilidir. Retinoblastom geninin ürünü olan retinoblastoma proteini (*pRb*), G₁ fazından S fazına geçiş sırasında hücre döngüsünün kontrolünü sağlayan bir tümör supressör proteindir (127). *pRb*, G₁ fazından S fazına geçiş sırasında hücre döngüsünün kontrolünü, E2F1 transkripsiyon faktörüne bağlanıp, onu inaktif hale getirerek gerçekleştirmektedir (128). G₁ fazı boyunca E2F1 *pRb*' ye bağlı olduğu için E2F1 molekülü inaktiftir. Böylece E2F1, hücre döngüsünün ilerlemesi için gerekli olan DNA sentezini başlatacak olan genlerin transkripsiyonunu arttıramaz ve hücre döngüsü G₁/S kontrol noktasında durur (129).

Tedavisiz yaşam süreleri ve sağ kalım süreleri normal karyotipli hastalarla benzer bulunmuştur (130 ay). 13q14 lokusu *MIRN15A* ve *MIRN16-1* olarak adlandırılan iki mikroRNA' yı içerir. Bu mikroRNA' lar da "RNA engelleme" yoluyla *bcl-2*'yi posttranskripsiyonel aşamada negatif olarak etkiler. Sonuç olarak 13q14 delesyonunun varlığında, bu mikroRNA' lar da olmayacağından, anti-apoptotik protein olan *bcl-2*'nin üzerindeki negatif baskı ortadan kalkacağından *bcl-2* proteini aşırı miktarda eksprese olur ve KLL hücreleri apoptozdan kaçabilen konuma gelirler (101).

2.3.6.5. Daha az sıklıkla görülen kromozomal abnormaliteler

KLL olgularının % 2-6' sında görülen 6q delesyonu diğer lenfatik malignitelerde de görülebilir (103,135). 6q delesyonu olan hastalar ortalama yaşam süreleri bakımından orta derecede risk grubundadır (135). 6q25-26' da bulunan genin KLL patogenezi ile ilişkisi henüz bilinmemektedir. Bu bölgenin delesyonunun bilinmeyen tümör supresör genleri inaktive ettiği düşünülmektedir (136).

8q24' teki değişiklikler KLL hastalarının % 5' inde bulunmaktadır. Bu da Myc geninin aşırı ekspresyonu ile ilişkilidir. Myc ekspresyonu KLL' li hastalarda DNA hasarı ile oluşan apoptoza direkt olarak sorumludur ve kötü prognozla ilişkilidir (136).

Trizomi 8, 14q32 translokasyonu ve trizomi 3 anormallikleri de tanımlanmıştır. Bu anormalliklerde sağ kalım daha iyidir (101).

Sonuç olarak KLL hastalarında hastalığın ilerlemesi sırasında klonal evrime öncülük eden ilave genetik değişiklikler oluşabilmektedir. Yapılan çalışmalarda, karyotipik evrim sıklıkları 1 ay ile 12 yıllık zaman dilimi arasında % 11 ile % 62 arasında dağılmaktadır. Birçok bilim adamı klonal evrim varlığı ile prognoz arasında anlamlı bir ilişki olduğunu tanımlamışlardır (126).

2.3.6.6. Sitogenetik abnormalite saptanamayan KLL' ler

KLL olgularının % 20-40' ında, tüm yeni teknolojik gelişmelerin uygulanmasına rağmen sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemlerle saptanabilen genetik abnormaliteler gösterilemez (101). Döhner ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, KLL olgularının % 18' inde FISH yöntemi uygulanarak bakıldığında herhangi bir sitogenetik abnormalite belirlenememiştir. Sitogenetik abnormalitelerin olmaması iyi klinik prognozla ilişkilendirilmektedir (101,103). Karyotipi normal olan KLL olgularında sağ kalım süresi 111 ay olarak saptanmıştır (101).

2.3.6.7. IgVH mutasyonu

B lenfositleri, gelişimleri sırasında çok çeşitli antijenleri tanıyabilme ve onlara karşı antikor yapabilme kapasitesine sahiptirler. Hücrelerin erken gelişim döneminde IgVH zincirinin V ve D gen bölümleri, J bölümüyle kendine özgü rekombinasyon yapar ve lenfositler yeni bir VDJ genetik yapı kazanır. VDJ seçildikten sonra, antijene maruz kalan lenfositler germinal merkezde somatik mutasyona uğrarlar (130). B hücre olgunlaşması (immünoglobulin sentezi yapma kapasitesi kazanması), germinal merkez içerisinde antijenle karşılaştıktan sonra oluşan ağır zincir genlerinin somatik mutasyonunu içermektedir (131).

KLL hastalarında yapılan araştırmalarda, KLL hücreleri pregerminal merkezde Ig mutasyonu olmayan B hücreleri ve germinal merkezden geçerken Ig mutasyonu oluşan B hücreleri olarak iki farklı formdan oluşur (Tablo4) (10,132). Lösemik hücrelerin immünglobulin ağır zincirinin değişken gen bölgesinin somatik mutasyonu, KLL hastaların % 50 ila % 70' inde gösterilmiştir (10). Erken evredeki hastalarda, klinik evreden ve sitogenetik anormalliklerden bağımsız olması, IgVH mutasyon durumunun prognostik önemini göstermektedir (133).

KLL hastalarında sağ kalımın, IgVH mutasyonu ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. IgVH mutasyonu olan KLL hastalarında sağ kalım süresinin daha uzun olduğu belirtilmektedir. IgVH mutasyonu olmayan KLL' de ortalama sağkalım süresi 79-119 ay, IgVH mutasyonu olan KLL' de ise 293 aydır. IgVH mutasyonu olmayan hastalarda IgVH mutasyonu olan hastalara göre ilerleyici hastalık, atipik lenfosit morfolojisi, kötü prognostik sitogenetik bulgular ve tedaviye direnç daha fazladır (10,47,131).

IgVH mutasyonu görülen KLL hastaları, iyi bir klinik gidiş göstermeleri, mutasyonu olmayanlara göre daha az tedaviye ihtiyaç duymaları, tedavisiz geçen süre daha uzun olması ve yaşam süreleri de, mutasyonu olmayanlara göre dikkate değer derece uzun olması nedeniyle KLL hastalarında IgVH gen mutasyonunun varlığı, iyi bir prognostik faktör olarak ortaya konmuştur (47,134).

Tablo 4. IgVH Bölgesinde Somatik Mutasyonu Olan ve Olmayan KLL Hastalarının Klinik ve Biyolojik Özellikler

	Somatik Mutasyon negatif	Somatik Mutasyon pozitif
Hücre orjini	Germinal Merkez öncesi	Germinal Merkez sonrası (hafıza hücre)
İmmüfenotip	ZAP70(+)	ZAP70(-)
Sitogenetik	Trizomi12, del(11)(q22.3) veya del(17)(p13)	del(13)(q14)
Prognoz	Kötü(7-9 sene)	İyi(24-25 sene)
Lenf düğümü histolojisi	Proliferasyon merkezleri yok	Proliferasyon merkezleri genellikle var

Bununla beraber IgVH mutasyonunun analizi, karmaşık, pahalı ve çalışma süresi uzundur. Bu nedenle rutin tanısal laboratuvar testi olarak kullanılmamaktadır (10,131).

Diğer taraftan, germinal merkezdeki lenfositler CD38 yüzey antijenlerini bulundurdıklarında, apoptozdan kendilerini korurlar. CD38 genelde germinal merkezdeki lenfositlerde sentezlendiği için, germinal merkezden geçip somatik mutasyona uğrayan lenfositlerin ve buna eşdeğer olan olgunlaşmış lenfoma ve

lösemi hücrelerinin de CD38 sentezleyebileceği düşünülmektedir (10). Pregerminal merkezli lösemik hücrelerde CD38 ekspresyonunun yüksek, ancak mutasyona uğramış hücrelerde düşük olması nedeni ile IgVH mutasyonunu göstermede CD38 ekspresyonunun kullanılabileceği öne sürülmüştür. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda, IgVH mutasyonu ve CD38 ekspresyonu birbirinden bağımsız prognostik faktörler olarak değerlendirilmektedir (51,69).

2.4. KLL ve Apoptoz

KLL programlanmış hücre ölümü için klasik bir örnektir ve hücreler çoğunlukla hücre siklusunun G₀ fazındadır. Bu durumda KLL hastalığı, B-hücrelerinin aşırı çoğalmasından ziyade, apoptoza uğramamasından kaynaklanmaktadır. Genelde apoptozu yaratan mekanizma zincirleme proteinleri aktive eden bir sistemdir. Bu proteinler arasında en önemli moleküller; kaspaz sistemi, mitokondrideki proteinler (bax, bcl2, bclXL, mcl-1) ve sitoplazmadaki apoptozu engelleyen proteinlerdir (IAP-1, IAP2 gibi). Bu sistemler arasında KLL ile ilgili bilgilerimiz çoğunlukla mitokondrideki proteinlerde odaklanmıştır. KLL' de ana apoptotik yolak mitokondri sitokrom-c yolağıdır. Kaspaz aktivasyonu, programlanmış hücre ölümü oluşmasında en önemli faktörlerden biridir. Mitokondriye ölüm sinyali geldiğinde, iç duvarındaki sitokrom c mitokondrial membran permeabilitesinin bozulmasıyla sitoplazmaya geçer. Sitoplazmaya geçen sitokrom-c, Apaf-1 (apoptoz aktive edici faktör) ve kaspaz-9 ile birleşerek bir kompleks oluşturur ve kaspaz kaskadının başlamasına yol açar. KLL' de Kaspaz 3, 6 ve 7' de azalma apoptotik yolağın önemli basamağını oluşturur (137).

Tümör nekroz faktör (TNF) ölüm reseptörleri (DRs) de programlanmış hücre ölümünde önemli rol oynamaktadır. Bu reseptörler TNF- related apoptozis inducing ligand (TRAIL) olarak adlandırılmakta ve sitozolde reseptörlerin bulunduğu bölge ölüm bölgesi olarak adlandırılmaktadır (138).

Bcl-2 protein ailesinin üyeleri, programlanmış hücre ölümünün anahtar düzenleyicisi olarak çalışırlar. Bcl-2 protein ailesinden bazıları (Bax, Bcl-xs, Bak, Bad) programlanmış hücre ölümünü indüklerken, bazıları (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) inhibe etmektedir (139). KLL' li hastaların %90' ında hücreler yüksek Bcl-2 seviyesine sahiptir ve bu nedenle KLL' de lenfositler uzun süre yaşamaktadırlar (139).

Bazı çalışmalarda KLL hücrelerinde Bcl2, BclXL, ve Mcl-1 proteinlerinin fazla olduğu ve KLL hücrelerinin bu yüzden apoptoza uğramadığı savunulmuştur (140). Ancak bazı yayınlarda Bcl-2' nin, sitokinlerin veya hormonların direkt etkisi ile de fazla sentez ediliyor olabileceği savunulmuştur. Nasıl bir mekanizmayla aktive olduğu bilinmese de bazı klinik çalışmalarda Bcl-2' nin yapımını bloke ederek kemoterapinin daha başarılı olacağı düşünülmüştür (137,140). Ayrıca yeni yapılan bir çalışmada; bazı KLL hastalarının Mcl-1 promotorundaki mutasyonunun hastalığı kemoterapiye dirençli bir duruma dönüştürdüğü gösterilmiştir (140).

KLL' de hücre bölünmesinde de anormallikler gözlenmektedir. Siklin bağımlı kinazlarda (CDK) değişiklikler gözlenmektedir. KLL hücrelerinin G₀/G₁

fazında olduğunu belirleyen siklin D2 ve D4' te artış saptanmıştır (50). Ayrıca olguların %25' inde G₁/ S evresinden geçişte etkili olansiklin D1 varlığı da rapor edilmiştir (141).

2.5. Tedavi

2.5.1.Tedavi öncesi değerlendirme (24)

- Öykü ve fizik inceleme
- Tam kan sayımı ve çevresel kan yayması
- Kan biyokimyası : Glukoz, kan üre azotu (BUN), kreatinin, laktat dehidrogenaz (LDH), ürik asit, alanin transaminaz (ALT), aspartat transaminaz (AST), alkalen fosfataz (ALP), albumin, bilirubin düzeylerinin belirlenmesi
- Serum protein elektroforezi ve immünfiksasyon analizi
- Kantitatif immunglobulin düzeyleri
- Retikülosit sayısı ve direkt Coombs testi
- Viral seroloji: HBV (Hepatit B virüsü), HCV (Hepatit C virüsü), HIV (Kazanılmış immün yetersizlik virüsü), özellikle immünokemoterapi sonrası Hepatit B reaktivasyon riski nedeniyle risk faktörü olmayan hastalarda HbsAg (Hepatit B yüzey antijeni) ve anti-HBC (Hepatitis B kor antikoru), risk faktörü olan ya da önceden hepatit B öyküsü olanlarda HbEAg pozitiflik saptandığında viral yük değerlendirilmesi yapılmaktadır.
- Doğurganlık çağındaki kadınlarda gebelik testi
- Kardiyak işlevlerin değerlendirilmesi
- Evreleme için Modifiye Rai ve Binet sistemi
- Tedavi endikasyonu konulduğunda FISH ile 17p delesyonu tayini

2.5.2. Tedavi Endikasyonları

Erken evre SLL ve KLL tedavilerinde bazı değişiklikler olsa da ileri evre hastalıkta tedavi protokolü aynıdır. KLL seyri değişken bir hastalıktır. Erken evredeki olguların önemli bir kısmında tedaviden bağımsız olarak uzun bir yaşam söz konusu olabilir. Rai I veya II ve Binet A evresinde bulunan 2048 hastayı içeren 6 prospektif randomize çalışmada erken evrede klorombusil başlanan hastalarda tedavi almayan gruba göre yaşam süresinde anlamlı uzama görülmemiştir. Yeni ajanlarla KLL' deki tam remisyon oranlarında belirgin artma saptanmıştır. KLL' de erken evrede tedavi için acele edilmezken; SLL' de erken evrede radyoterapi bir tedavi seçeneği olabilmektedir. Ancak bazı hastalar tanıdan 1-2 yıl sonra hayatını

kaybedilebildiği için hangi hastanın ne zaman tedavi edileceği önemli bir sorundur (24).

2008 yılında bildirilen Uluslararası Kronik Lenfositik Lösemi Çalıştay'ında önerilen kılavuz bilgilere dayalı olarak tedaviye başlama ölçütleri hastanın bir klinik çalışma ya da genel tedavi yaklaşımı içinde olup olmadığına göre değişkenlikler gösterebilmektedir. Genel yaklaşımda yeni tanı almış asemptomatik erken evre hastalıkta (Rai 0, Binet A) herhangi bir ilerleme bulgusu olmadıkça 3-6 aylık zaman dilimlerinde tedavisiz izlem önerilmektedir (24).

Modifiye Rai sınıflamasına göre orta (Evre I ve II) ve yüksek risk (Evre III ve IV) ya da Binet sınıflamasına göre B ve C evresindeki hastalar genellikle tedavi uygulanmasından yarar görmektedir. Bu hastalardan bir kısmı (Rai orta risk ve Binet evre B) herhangi bir semptom ya da ilerleme bulgusu oluşmadıkça tedavisiz de izlenebilmektedir (16,28).

Aktif ya da ilerleyici hastalık tanımı için aşağıdaki ölçütlerden en az bir tanesinin varlığı gerekmektedir;

1. İlerleyici kemik iliği yetersizliği bulguları. Yeni ortaya çıkan ya da var olan hafif düzeydeki anemi, ve/veya trombositopeninin derinleşmesi
2. Masif (sol kosta kenarını en az 6 cm aşan) ya da ilerleyici veya semptomatik splenomegali
3. Masif (uzun çapı 10 cm'yi aşan) ya da ilerleyici veya semptomatik lenfadenopati
4. İlerleyici lenfositoz. Lenfosit sayısının 2 ay içinde %50'den fazla artması ya da LKS' nin 6 aydan kısa olması. Tanı anında lenfosit sayısı 30.000/μL'den az olan hastalarda tek parametre olarak lenfosit ikilenme zamanı, tedaviye başlamak için bir ölçüt olarak alınmamalıdır.
5. Kortikosteroidlere ya da standart tedavi yaklaşımlarına yanıt alınamayan otoimmün hemolitik anemi ve/veya trombositopeni.
6. Sistemik semptom varlığı
 - a. Son 6 ay içinde vücut ağırlığının %10'undan fazla kilo kaybı, belirgin halsizlik ve yorgunluk
 - b. Herhangi bir infeksiyon bulgusu olmaksızın 2 hafta ya da daha uzun süreli 38 dereceden daha yüksek ateş varlığı
 - c. Herhangi bir infeksiyon bulgusu olmaksızın 1 ay ya da daha uzun süreli gece terlemesi

Diğer ölçütler olmaksızın hipogamaglobulinemi ya da monoklonal veya oligoklonal protein varlığı ve yine aynı şekilde mutlak lenfosit sayısı tedaviye başlama açısından tek başına bir ölçüt olarak görülmemelidir.

Aktif ya da ilerleyici hastalık bulgusu olan ve tedavi endikasyonu belirlenen hastalarda ilk olarak 17p delesyonu araştırılması önerilmektedir (143,144).

- 17p delesyonu olmayan ve 70 yaş altı olup tedaviye uygun olan hastalarda önerilen tedavi yaklaşımı Rituximab (R) –fludarabin (F) - siklofosfamid (C)’dir. Bu hasta grubuna ayrıca R+F, pentostatin (P)+C+R, bendamustin (B) +R ve FC de uygulanabilir.
- 17p delesyonu olmayan ancak 70 yaş üzerindeki hastalara tek ilaç klorambusil, rituksimablı ya da rituksimabsız alkileyici ilaç kombinasyonları (R±CVP(R ± siklofosfamid, vinkristin, ve prednizon gibi)), fludarabin (R±F) veya bendamustin (R±B), doz azaltılmış R-FC ya da FC uygulanabilir.
- 17p delesyonu olmayan ancak eşlik eden hastalık ya da pürin analogu kullanamayacak hastalara klorambusil±R, tek ajan rituksimab ya da yüksek doz steroid uygulanabilir.
- 17p delesyonu olan hastalarda alemtuzumab (>5 cm kitlelerde etkinliği az), yüksek doz metilprednizolon+rituksimab, bendamustin ya da CFAR (siklofosfamid, fludarabin, alemtuzumab ve rituksimab) uygulanabilir. Yanıt elde edilse dahi yanıt devamlılık süresi oldukça kısa olacağından tam ya da kısmi yanıt elde edilmiş uygun vericisi ve tıbbi olarak uygun olan hastalara mutlaka allojenik hematopoietik kök hücre transplantasyonu önerilmektedir. Uygun vericisi olmayan ya da tıbbi uygunluk göstermeyen hastalar ile ilk yanıt sonrası nüks olan hastalarda beklenti oldukça kötüdür. Bu hasta grubuna R-CHOP (Rituximab, siklofosfamid, doksorubisin (hidroksirubisin), vinkristin ve prednizon), hiperCVAD, (siklofosfamid, vinkristin, doksorubisin ve deksametazon), ofatumumab ya da GA-101 (obinutuzumab) denenebilir.
- 17p delesyonu olmayan ve sonradan nüks olan olgular ile primer fludarabin direnci gösteren hastalar için genel kanı; immunokemoterapi uygulamalarından sonraki 24 aya da kemoterapi uygulamalarından sonraki 12 ay içinde olan nüksler, erken nüks olarak değerlendirilmektedir.
 - Geç nükslerde yeniden ilk sıra tedavi uygulanabilir.
 - 70 yaş altı erken nükslerde R-FC, R-PC, B±R, FluCAM (Alemtuzumab ve fludarabine kombinasyonu), CHOP±R (klorambusil +prednizolon, oral siklofosfamid ±R), hiperCVAD, EPOCH±R, CFAR, OFAR, ofatumomab, GA-101, alemtuzumab±R, yüksek doz metilprednizolon+R ya da kladribin±R denenebilir.
 - 70 yaş üstü hastalara doz azaltılmış R-FC, doz azaltılmış R-PC, B±R, yüksek doz metilprednizolon+R, klorambusil±R, ofatumomab, klorambusil±ofatumomab, GA-101 ya da doz yoğun tek ajan rituksimab uygulanabilir.
- Primer fludarabin direnci olan olgular;
 - Uygun donörü olan ve tıbben uygun olan hastalara allojeneik kök hücre nakli uygulanabilir.
 - Uygun donörü olmayan ya da tıbben uygun olmayan hastalara doz azaltılmış R-FC, doz azaltılmış R-PC, B±R, yüksek doz metilprednizolon+R, klorambusil±R, ofatumomab, klorambusil ±

ofatumomab, GA-101 ya da doz yoğun tek ajan rituksimab uygulanabilir.

- Histolojik transformasyon gösteren hastalar agresif lenfoma olarak tedavi edilir.

2.5.3. Yanıt değerlendirme

Yanıt değerlendirmede hastanın, fiziksel durumu ve kan parametreleri (hemogram) kullanılır. Başlangıçta herhangi bir nedenle görüntüleme teknikleri kullanılmış ise tekrar edilebilir (Ultrasonografi, akciğer grafisi ve bilgisayarlı tomografi gibi). Tam yanıt için (tedavi bitiminden en az 2 ay sonra) aşağıdaki ölçütlerin tümü karşılanmalıdır (146).

1. Çevresel kandaki lenfosit sayısı $<4000/\text{mm}^3$ olmalı
2. Palpe edilen lenfadenomegli olmamalı (1.5 cm ve altında olmalı)
3. Splenomegali ya da hepatomegali olmamalı
4. Konstitüsyonel bulgular olmamalı (kilo kaybı, ateş, gece terlemesi, anlamlı halsizlik)
5. Büyüme faktörü desteği olmaksızın kan tablosu normale dönmeli (Nötrofil $>1500/\text{mm}^3$, trombosit $>100.000/\text{mm}^3$, Hb $>11 \text{ g/dL}$)

Kısmi yanıt için aşağıdakilerin en az 2 tanesi olmalı ve en az 2 ay devam etmeli

1. Çevresel kan lenfosit sayısının başlangıç değere göre %50 ve üzerinde azalması
2. Etkilenen lenfadenomegalilerin boyutunun toplamının %50 ve üzerinde gerilemesi
3. Etkilenen hepatomegali ve/veya splenomegali boyutunun %50 ve üzerinde gerilemesi
4. Kan sayımlarından en az bir tanesinin normale dönmesi veya başlangıç göre %50 ve üzerinde artması

İlerleyici hastalık aşağıdakilerden herhangi birisinin varlığını gerektirir:

1. Lenfosit sayısının başlangıç değere göre %50 ve üzerinde artması
2. Lenf düğümü boyutlarının başlangıç değere göre %50 ve üzerinde artması
3. Hepatomegali ve veya splenomegali (boyutlarının %50 ve üzerinde artması)
4. Yeni lezyon varlığı

2.5.4. KLL hastalarında destek tedavisi (16)

- Yıllık influenza ve 5 yılda bir de pnömokok aşısı önerilmektedir.
- Sık tekrarlayan ve parenteral antibiyotik tedavi gerektiren hastalar uygun antibiyotiklerle tedavi edilmelidir. Serum IgG düzeyi $<500 \text{ mg/dL}$ olan olgulara ayrıca aylık intravenöz immunoglobulin tedavisi uygulanmalıdır (doz, 0.3-0.5 mg/kg).
- Pürin analogu ve/veya alemtuzumab uygulanan hastalara herpes virüs profilaksisi için asiklovir ya da eşdeğeri, Pneumocystis carinii içinse trimetoprim-sülfametaksazol önerilmektedir. Ayrıca alemtuzumab uygulanan hastalarda ya 1-2 haftada bir sitomeglovirüs antijenemisi araştırılması ya da tüm tedavi süresini ve tedaviden sonraki 2 ayı da içerecek şekilde valgansiklovir profilaksisi önerilmektedir.

- Rituksimab uygulanacak tüm hastalarda Hepatit B için HBsAg ve HBcAb testi bakılmalıdır. Tarama testlerinden birinde pozitiflik var ise PCR ile hepatit B viral yük değerlendirilmelidir. HBsAg ya da HBcAb pozitifliği olan her hastaya kemoterapi ile birlikte ampirik antiviral tedavi uygulanmalıdır. Tedavi süresince her ay, sonrasında 3 ayda bir PCR ile hepatit B viral yük izlemi yapılmalıdır.

2.5.5. Tedavi ve Sitogenetik

Yukarıdaki KLL hastalarının tedavisine yönelik protokol değerlendirildiğinde, tedaviyi belirlemede rol oynayan genetik değişiklik göze çarpmaktadır. Buda KLL’ de genetik değişikliklerin klinik önemini öne çıkardığından, bu çalışmada KLL tanısı alan olgularda 17p13 lokusundaki delesyon gibi bir diğer biyolojik marker olabilecek *MDM2* gen amplifikasyonu olup olmadığını belirlemek, var ise hastalığın evresi, prognozu ve ilaca dirençlilik ile ilişkisinin olup olmadığının gösterilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL METOT

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi erişkin Hematoloji Bilim Dalı'nda 2012-2013 yılında 20' si yeni tanı, 20' si ise retrospektif olmak üzere Kronik Lenfositik Lösemi tanısı almış toplam 40 olguya ait örnek çalışma grubunu oluşturmaktadır. KLL tanısında NCI tanı kriterleri (1996) esas alınmıştır. Kontrol grubunu ise, Philadelphia kromozomu pozitif (Ph+) olduğu belirlenmiş 20 Kronik Myeloid Lösemi olgusuna ait örnek oluşturmuştur. Tüm olguların materyalleri; Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi'ne rutin konsültasyonel sitogenetik analiz amacıyla gelen ve rutin kullanım sonrası artan kemik iliğinden oluşturulan pelletlerden elde edilmiştir. Çalışmaya alınan hastalar bilgilendirilerek yazılı onamları alınmıştır. Hastaların çalışmaya alındığı andaki yaşı, cinsiyeti, konvensiyonel sitogenetik ve moleküler sitogenetik sonuçları kaydedilmiştir. 40 KLL ve kontrol grubu olarak da 20 KML olgusuna ait kemik iliği örneğinden yapılan harvest sonrası elde edilen preparatlara, *MDM2* genine özgü işaretli prob kullanılarak FISH yöntemi uygulanmıştır.

3.1. Floresan *In Situ* Hibridizasyon (FISH) Yöntemi

3.1.1 Kullanılan Solüsyonlar

20X SSC (Sodyum Salin Citrat) Hazır Solüsyon

2X SSC SSC

Hazır 20X SSC (AppliChem) solüsyonundan 10 ml alınıp, üzerine 90 ml distile su ilave edilerek, hacim 100 ml' ye tamamlandı.

0.4X SSC / %0.3 NP40 ((Nonident P40 Substitute) Yıkama solüsyonu

Hazır 20X SSC solüsyonundan 2 ml alınıp, üzerine 98 ml distile su ve 300µl NP40 (Biochemika) ilave edilerek hazırlandı.

2X SSC / %0.1 NP40 ((Nonident P40 substitute) Yıkama solüsyonu

Hazır 20X SSC solüsyonundan 10 ml alınıp, üzerine 90 ml distile su ve 100µl NP40 ilave edilerek hazırlandı.

1M HCL (Hidrojen Klorür)

Hazır HCl (Emprove) solüsyonundan 8.3 ml alınıp, üzerine 100 ml distile su ilave edilerek stok solüsyon elde edildi.

Pepsin

100 mg pepsin (Ambresco) tartılarak 10 ml distile suda çözüldü. Hazırlanan stok pepsin karışımından 1 ml alınıp üzerine 9 ml distile su eklendi. Elde edilen bu

karışım daha sonra kullanılmak üzere 1' er ml' lik enjektörlere çekilerek -20 °C saklandı.

0.01N HCL (Hidrojen Klorür)

Stok olarak hazırlanan 1M HCL solüsyonundan 1 ml alınıp, üzerine 99 ml distile su ilave edildi. Kullanımdan hemen önce, 1 ml'lik pepsin solüsyonu oda sıcaklığına çıkarıldı. Eridikten sonra karışımın içine ilave edildi.

1X PBS (Fosfat Buffer Salin) Yıkama Solüsyonu

1 tablet hazır PBS' in (MP Biomedicals) 100 ml distile suda çözülmesi ile elde edildi.

Post Fiksasyon Solüsyonu

0.36 gr $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Ambresco) tartıldı. 2 ml paraformaldehit (Merck) solüsyonunun üzerine tartılan $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ve 78 ml hazır 10X PBS eklenerek post fiksasyon solüsyonu elde edildi.

Etanol Serileri

Preparatı dehidrate etmek amacıyla; %70, %85 ve %100' lük etanol (Merck) serileri hazırlandı. %70 ve %85' lik etanol serileri absolü etanole sırasıyla 30 ml ve 15 ml distile su katılarak hazırlandı.

3.1.2. Kullanılan FISH Probu'nun İçeriği (Vysis)

- *MDM2* FISH Probu (Vysis LSIMDM2 kırmızı florokrom işaretli DNA probu, 20µl)
- *MDM2* Hibridizasyon Solüsyonu (Vysis, 150µl)
Formamid, sodyum klorit ve sodyum sitrat içerir.
- CEP DNA FISH probu (Vysis CEP12 yeşil florokrom işaretli DNA probu, 20µl)
- CEP Hibridizasyon Solüsyonu (Vysis, 150µl)
Formamid, sodyum klorit ve sodyum sitrat içerir.
- DAPI II Counterstain Solüsyonu (Vysis, 4',6-diamidino-2-phenylindole, p-phenylendiamine, 1000µl)

3.1.3. FISH Tekniğinin Uygulanması

3.1.3.1.Preparatın Hazırlanması

- Olgulardan rutin kromozom eldesi yöntemi uygulanarak, son aşamada üç kez fiksatifle yıkanan kemik iliği kültür materyalleri +4 °C' den çıkartılıp 2000 rpm' de 4 dakika santrifüj edildi.
- Temizlenmiş lamalar, %100' lük metanol (Emsure) içinde 2 dakika bekletildi. Süre sonunda yumuşak bir bez ile iyice kurulandı.
- Santrifüj sonrası materyalden üstte kalan dökelti, dipteki çökeltinin yoğunluğuna uygun olarak bir miktar bırakıldı. Yavaşça pipetaj yapılarak çökelti homojen hale getirildi. Metanolden çıkarılıp kurulan temiz lamlara bu örnekten 1 damla damlatılarak preparatlar hazırlandı.
- Üzerinde interfaz hücreleri bulunan yayılmış preparatlar 1 gece oda ısısında yaşlandırıldı.
- Su banyosu 37 °C' ye ayarlandı. 2X SSC ve 0.01 N HCl solüsyonları su banyosuna konarak 37 °C' ye gelmesi sağlandı.
- Preparatlar 37 °C 'lik su banyosunda 2XSSC içerisinde 30 dakika bekletildi.
- 2X SSC solüsyonundan çıkartılan preparatlar 37 °C' lik su banyosunda 0.01 N HCl / %1 Pepsin solüsyonu içerisinde 15 dakika bekletildi. (Pepsin kullanımdan hemen önce eritilerek solüsyona eklendi.)
- 0.01 N HCl / %1 Pepsin solüsyonundan çıkarılan preparatlar daha sonra oda ısısındaki 1X PBS içerisinde 1 dakika bekletildi.
- Daha sonra oda ısısındaki Post Fiksasyon solüsyonu içerisinde preparatlar 10 dakika bekletildi.
- Post Fiksasyon solüsyonundan çıkarılan preparatlar tekrar oda ısısındaki 1XPBS içerisinde 3 dakika bekletildi.
- Preparatlar havada kurutuldu.

3.1.3.2.Preparatın Dehidratasyon Aşaması

- Preparatlar, %70, % 85 ve %100 alkol serisinde 2'şer dakika bekletildi.
- Preparatlar havada iyice kurutuldu.
- 1 µl probun üzerine 2 µl steril distile su, 7µ tampon (LSI buffer) ilave edilerek prob kullanıma hazır hale getirildi.
- Elde edilen karışım çok kısa süre vortekslendi.

- Hazırlanan 10 µl' lik prob karışımı lamele damlatıldı ve üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde lam kapatıldı.
- Lamelin etrafı rebber semen ile çevrildi.
- 37 °C' ye ayarlı etüvde 10 dakika kuruması için bekletildi.

3.1.3.3 DenatürasyonAşaması\ Hibridizasyon Aşaması

Hem hedef hem de prob DNA' sının denatürasyonu için preparatlar karşılıklı ve dengeli bir şekilde hibridizasyon cihazına (HyChrome) yerleştirildi ve cihaz denatürasyon için 75 °C' de 5 dakika, hibridizasyon için 37 °C' de 20 saate ayarlanmış olan programda çalıştırıldı.

3.1.3.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkama

Ertesi gün preparatlar hibridizasyon cihazından çıkartıldıktan sonra lameller, etrafındaki rebber semen ile birlikte kaldırıldı.

73 °C 'ye ayarlanan su banyosuna 0.4XSSC / %0.3 NP40 solüsyonu konuldu. Solüsyonun ısı kontrol edilerek 73 °C' ye geldiğinde lamalar bu solüsyon içerisinde 2 dakika bekletildi.

Daha sonra lamalar oda ısısındaki 2XSSC / %0.1 NP40 solüsyonu içerisinde 1 dakika bekletildi.

Lamalar 2XSSC / %0.1 NP40 solüsyonundan dikey bir şekilde, lam üzerindeki fazla solüsyonun uzaklaştırılması sağlanarak çıkarıldı. Ancak lamen tamamen kurumamasına dikkat edildi.

24X 24 mm boyutlarındaki lamellere 10' ar µl DAPI II solüsyonu damlatıldı. Lamalar bu lameller ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı.

Daha iyi sinyal alınabilmesi için preparatlar hibridizasyon kutusuna konularak +4 °C ' de 10 dakika bekletildi.

Preparatlar floresan mikroskop (Zeiss İmager M₁) altında ve Metafer 4 V3.9.0 programında incelendi. Her olguya ait preparattan 400 interfaz hücresi DAPI filtresi kullanılarak tespit edildi. Uygun büyüklükteki hücrelerden kırmızı (*MDM2*' ye spesifik) ve yeşil spektrumlu (12. kromozomun sentromerine spesifik) filtreler kullanılarak sinyaller sayıldı. Her olguya ait görüntüler bilgisayar ortamında kaydedildi ve sonuçlar değerlendirilerek yorumlandı.

BULGULAR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Polikliniği' ne başvurmuş ve NCI-WG ölçütlerine göre tanı almış 40 Kronik Lenfositik Lösemi' li olgu ve kontrol grubunu oluşturan 20 Kronik Myeloid Lösemi' li olguların kemik iliğinden aspire edilen örnekler, çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Çalışma grubunu oluşturan KLL olgularının ilk 20'si 2012 öncesi, diğer 20'si ise 2012-2013 yılları arasında yeni tanı almıştır.

KLL' li olguların 10' nu kadın (%25), 30' u erkek (%75) olup, Kadın / Erkek oranı : 1/3 olarak bulunmuştur. Çalışmaya alınan hastaların yaş ortalamaları 62.7, kontrol grubunu oluşturan 20 KML hastasının yaş ortalaması ise 44.5 olarak belirlenmiştir.

Tanı anında KLL hastalarından 13 hasta (% 32.5) Binet A, 17 hasta (% 42.5) Binet B ve 10 hasta Binet C (% 25) evresinde; Rai evrelendirme sistemine göre de 13 hasta (% 32.5) Rai 0, 9 hasta (% 22.5) Rai I, 8 hasta (% 20) Rai II, 5 hasta (% 12.5) Rai III ve 5 hasta (% 12.5) Rai IV evresinde bulunmuştur.

Hastaların yaş, cinsiyet, konvansiyonel sitogenetik ve moleküler sitogenetik sonuçları ile uygulanan tedavi ve tedaviye yanıt sonuçları Tablo 5' de görülmektedir.

FISH yöntemi uygulanan 40 KLL' li olgunun 28' inde (%70) 2 kırmızı 2 yeşil sinyal paterni gözlenmiştir (Şekil 3a). *MDM2* gen amplifikasyonunu gösteren sinyal paterni hiçbir olguda gözlenmezken (2 yeşil, çoklu kırmızı sinyal), 12 olguda (%30) ise 12. kromozom trizomisini gösteren 3 kırmızı 3 yeşil sinyal paterni gözlenmiştir (Şekil 3b).

Tablo 5: Hastaların yaş, cinsiyet, konvansiyonel sitogenetik ve moleküler sitogenetik sonuçları ile uygulanan tedavi ve tedaviye yanıt sonuçları

Olgu No	Eresi	Yaş / Cinsiyet	MDM2 abnormalitesi açısından FISH sonucu	MDM2 abnormalitesi açısından FISH yorumu	Sitogenetik Sonucu	FISH ile belirlenen diğer abnormaliteler	FISH Yorumu	Karar	Uygulanan tedavi	Tedaviye yanıt
1	4	55/E	2K2Y[400]	Normal	1.sitogenetik: —* 2.sitogenetik: 46,XY[15]	- nuc ish 11q22.3 (ATM×1), D11Z1×2 [304/400], - nuc ish 17p13.1 (TP53×1), D17Z1×2 [48/400] - nuc ish 6q23 (MYB×2D6Z1×2) [36/400] - Abnormalite gözlenmemiştir	%76 oranında ATM genini içeren 11q22.3 bölgesinin delesyonu %20 oranında p53 genini içeren 17p13.1 bölgesinin delesyonu %9 oranında 6q23 bölgesinde delesyon	Tedavi Remisyon	2 kür HDMP 4kür R-HDMP Remisyon	
2	1	74/E	3K3Y [200/400]	%50 oranında 12. kromozomun trizomisi	46,XY[8]	- nuc ish 13q14 (RB1×1), 13qtel (CTB-163C9×2) [116/400] - nuc ish (12p11.1-q11.1×3) [240/400]	%29 oranında RB1 genini içeren 13q14 bölgesinin delesyonu %60 oranında 12. kromozomun trizomisi	Takip		
3	0	75/E	2K2Y[400]	Normal	46,XY[11]	- nuc ish 13q14 (RB1×1), 13qtel (CTB-163C9×2) [56/400] - nuc ish 17p13.1 (TP53×1), (D17Z1×2) [208/400]	%14 oranında RB1 genini içeren 13q14 bölgesinin delesyonu %52 oranında p53 genini içeren 17p13.1 bölgesinin delesyonu	Takip Dışı		

Olgu No	Evresi	Yaş / Cinsiyet	MDM2 abnormalitesi açısından FISH sonucu	MDM2 abnormalitesi açısından FISH yorumu	Sitogenetik Sonucu	FISH ile belirlenen diğer abnormaliteler	FISH Yorumu	Karar	Uygulanan tedavi	Tedaviye yanıt
4	1	70/E	2K2Y[400]	Normal	46,XY[15]	- nuc ish 11q22.3 (ATM×1), D11Z1×2 [220/400] - nuc ish 13q14 (RB1×1), 13qtel (CTB-163C9×2) [280/400]	%55 oranında ATM genini içeren 11q22.3 bölgesinin delesyonu %70 oranında RB1 genini içeren 13q14 bölgesinin delesyonu	Takip Dışı		
5	2	64/E	2K2Y[400]	Normal	46,XY[13]	nuc ish17p13.1 (TP53×1), D17Z1×2 [64/400]	%16 oranında p53 genini içeren 17p13.1 bölgesinin delesyonu	Takip Dışı		
6	0	58/E	2K2Y[400]	Normal	46,XY[25]	nuc ish 13q14 (RB1×1), 13qtel (CTB-163C9×2) [160/400]	%40 oranında RB1 genini içeren 13q14 bölgesinin delesyonu	Takip Dışı		
7	2	68/E	2K2Y[400]	Normal	—*	nuc ish 13q14 (RB1×1), 13qtel (CTB-163C9×2) [120/400]	%30 oranında RB1 genini içeren 13q14 bölgesinin delesyonu	Takip Dışı		
8	4	40/K	2K2Y[400]	Normal	1.sitogenetik: —* 2.sitogenetik: 46,XX[8]	- nuc ish17p13.1 (TP53×1), D17Z1×2 [372/400] - nuc ish17p13.1 (TP53×1), D17Z1×2 [370/400]	%93 oranında monozomi 17 %92 oranında p53 genini içeren 17p13.1 bölgesinin delesyonu	Tedavi	2 Kür HDMP Tedaviye CVP eklenmiş	Progresyon EX

Olgu No	Evresi	Yaş / Cinsiyet	MDM2 abnormalitesi açısından FISH sonucu	MDM2 abnormalitesi açısından FISH yorumu	Sitogenetik Sonucu	FISH ile belirlenen diğer abnormaliteler	FISH Yorumu	Karar	Uygulanan tedavi	Tedaviye yanıt
9	0	71/E	3K3Y [165/400]	%43.7 oranında 12. kromozomun trizomisi	46,X,Y[13]	• nuc ish (12p11.1-q11.1×3) [175/400]	• %43.7 oranında 12. kromozomun trizomisi	Takip Dışı		
10	1	55/K	3K3Y [40/400]	%10 oranında 12. kromozomun trizomisi	46,X,Y[12]	• nuc ish (12p11.1-q11.1×3) [32/400]	• %8 oranında 12. kromozomun trizomisi	Takip		
11	0	65/K	3K3Y [200/400]	%50 oranında 12. kromozomun trizomisi	48,XX,+12,+mar[4] / 46,XX [4]	• nuc ish (12p11.1-q11.1×3) [240/400]	• %60 oranında 12. kromozomun trizomisi	Takip Dışı		
12	0	70/E	2K2Y[400]	Normal	46,X,Y[14]	—**	—**	Takip Dışı		
13	2	71/K	3K3Y [300/400]	%75 oranında 12. kromozomun trizomisi	1.sitogenetik: —* 2.sitogenetik: —*	• nuc ish 17p13.1 (TP53×1), D17Z1×2 [80/400] • nuc ish (12p11.1-q11.1×3) [304/400]	• %20 oranında p53 genini içeren 17p13.1 bölgesinin delesyonu • %76 oranında 12. kromozomun trizomisi	Takip Tedavi	2 Kür HDMP 6 kür HDMP	Progresyon Tedavi Devam Etmektedir
14	2	69/E	3K3Y [158/400]	%39.5 oranında 12. kromozomun trizomisi	—*	• nuc ish (12p11.1-q11.1×3) [167/400]	• %42 oranında 12. kromozomun trizomisi	Takip		
15	0	55/K	2K2Y[400]	Normal	46,XX[15]	—**	—**	Takip		

Olgu No	Evresi	Yaş / Cinsiyet	MDM2 abnormalitesi açısından FISH sonucu	MDM2 abnormalitesi açısından FISH yorumu	Sitogenetik Sonucu	FISH ile belirlenen diğer abnormaliteler	FISH Yorumu	Karar	Uygulanan tedavi	Tedaviye yanıt
16	1	66/E	2K2Y[400]	Normal	46,XX[10]	• nuc ish17p13.1 (TP53×1), D17Z1×2 [80/400]	• %20 oranında p53 genini içeren 17p13.1 bölgesinin delesyonu	Takip dışı		
17	2	43/E	2K2Y[400]	Normal	46,XY[14]	• nuc ish17p13.1 (TP53×1), D17Z1×2 [136/400]	• %34 oranında p53 genini içeren 17p13.1 bölgesinin delesyonu	Takip dışı		
18	1	60/E	2K2Y[400]	Normal	1. sitogenetik: —* 2. sitogenetik: —* 3. sitogenetik: 46,XY[10]	—** —** • nuc ish17p13.1 (TP53×1), D17Z1×2 [80/400]	—** —** • %20 oranında p53 genini içeren 17p13.1 bölgesinin delesyonu	Tedavi Remisyon Nüks	6 Kür F 4 kür HDMP	Remisyon Takip dışı
19	3	51/E	2K2Y[400]	Normal	1. sitogenetik: —* 2. sitogenetik: —*	—** • nuc ish17p13.1 (TP53×1), D17Z1×2 [216/400]	—** • %54 oranında p53 genini içeren 17p13.1 bölgesinin delesyonu	Tedavi Progresyon	6 kür FC 2 kür R-HDMP, 1 kür FC	EX
20	0	50/K	2K2Y[400]	Normal	46,XX[13]	• nuc ish 13q14 (RB1×1), 13qtel (CTB163C9×2) [32/400]	• %8 oranında RB1 genini içeren 13q14 bölgesinin delesyonu	Takip		

Olgu No	Evresi	Yaş / Cinsiyet	MDM2 abnormalitesi açısından FISH sonucu	MDM2 abnormalitesi açısından FISH yorumu	Sitogenetik Sonucu	FISH ile belirlenen diğer abnormaliteler	FISH Yorumu	Karar	Uygulanan tedavi	Tedaviye yanıt
21	0	70K	2K2Y[400]	Normal	1.sitogenetik: 47,XX, inv(9)(p11q13), del(13)(q14), +21[1] / 46,XX, inv(9)(p11q13)[21]	- nuc ish 11q22.3 (ATM×1), D11Z1×2 [128/400], - nuc ish 13q14 (RB1×1), 13qtel (CTB163C9×2) [128/400] - nuc ish 17p13.1 (TP53×1), D17Z1×2 [40/400]	%32 oranında ATM genini içeren 11q22.3 bölgesinin delesyonu %32 oranında RB1 genini içeren 13q14 bölgesinin delesyonu %10 oranında p53 genini içeren 17p13.1 bölgesinin delesyonu	Takip		
					2.sitogenetik: 46,XX, inv(9)(p11q13)[15]	- nuc ish 11q22.3 (ATM×1), D11Z1×2 [72/400], - nuc ish 13q14 (RB1×1), 13qtel (CTB163C9×2) [48/400] - nuc ish 17p13.1 (TP53×1), D17Z1×2 [50/400]	%18 oranında ATM genini içeren 11q22.3 bölgesinin delesyonu %12 oranında RB1 genini içeren 13q14 bölgesinin delesyonu %12.5 oranında p53 genini içeren 17p13.1 bölgesinin delesyonu	Progresyon	5 kür CVP, 6 kür Rutiksimab	
					3.sitogenetik: 46,XX, inv(9)(p11q13)[7]	- nuc ish 11q22.3 (ATM×1), D11Z1×2 [140/400], - nuc ish 13q14 (RB1×1), 13qtel (CTB-163C9×2) [248/400], - nuc ish 17p13.1 (TP53×1), D17Z1×2 [68/400]	%35 oranında ATM genini içeren 11q22.3 bölgesinin delesyonu %62 oranında RB1 genini içeren 13q14 bölgesinin delesyonu %17 oranında p53 genini içeren 17p13.1 bölgesinin delesyonu	Progresyon	Tedaviye Bendamustin eklenmiştir.	Tedavi Devam Etmektedir

Olgu No	Evresi	Yaş / Cinsiyet	MDM2 abnormalitesi açısından FISH sonucu	MDM2 abnormalitesi açısından FISH yorumu	Sitogenetik Sonucu	FISH ile belirlenen diğer abnormaliteler	FISH Yorumu	Karar	Uygulanan tedavi	Tedaviye yanıt
22	3	60/E	3K3Y [300/400]	%75 oranında 12. kromozomun trizomisi	1.sitogenetik: —* 2.sitogenetik: 46,XY[15] —**	• nuc ish (12p11.1-q11.1×3) [120/400] • nuc ish17p13.1 (TP53×1), D17Z1×2 [100/400], • nuc ish (12p11.1-q11.1×3) [100/400] • Abnormalite gözlenmemiştir	• %30 oranında 12. kromozomun trizomisi • %25 oranında p53 genini içeren 17p13.1 bölgesinin delesyonu • %75 oranında 12. kromozomun trizomisi	Takip Tedavi Remisyon	6 kür F	Remisyon
23	3	65/E	3K3Y[400]	Normal	1. Sitogenetik: —* 2.Sitogenetik: 46,XY [10]	—** —**	—** —**	Tedavi Remisyon	6 kür FC	Remisyon
24	1	68/K	3K3Y [220/400]	%55 oranında 12. kromozomun trizomisi	1.Sitogenetik: 46,XX [12] 2. Sitogenetik: —* 3. Sitogenetik: —*	—** • nuc ish17p13.1 (TP53×1), D17Z1×2 [56/400], • nuc ish (12p11.1-q11.1×3) [300/400] —**	—** • %14 oranında p53 genini içeren 17p13.1 bölgesinin delesyonu • %75 oranında 12. kromozomun trizomisi —**	Takip Tedavi Remisyon	6 kür R-1 kür HDMP	Remisyon

Olgu No	Evresi	Yaş / Cinsiyet	MDM2 abnormalitesi açısından FISH sonucu	MDM2 abnormalitesi açısından FISH yorumu	Sitogenetik Sonucu	FISH ile belirlenen diğer abnormaliteler	FISH Yorumu	Karar	Uygulanan tedavi	Tedaviye yanıt
25	0	65/E	3K3Y [250/400]	%62.5 oranında 12. kromozomun trizomisi	46,XY[10]	• nuc ish (12p11.1-q11.1×3)[300/400]	• %75 oranında 12. kromozomun trizomisi	Takip dışı		
26	2	71/K	2K2Y[400]	Normal	46,XX[10]	• nuc ish 13q14(RB1×1), 13qtel(CTB-163C9×2) [140/400] • nuc ish 17p13.1 (TP53×1), (D17Z1×1) [52/400]	• %35 oranında RB1 genini içeren 13q14 bölgesinin delesyonu • %13 oranında monozomi 17	Tedavi	6 kür R-FC	Takip
27	1	67/E	3K3Y [220/400]	%55 oranında 12. kromozomun trizomisi	1. Sitogenetik: —* 2. Sitogenetik: 46,XY[5]	—** • nuc ish (12p11.1-q11.1×3)[280/400]	—** %70 oranında 12. kromozomun trizomisi	Takip dışı		
28	0	48/E	2K2Y[400]	Normal	1. Sitogenetik: 46,XY[15] 2. Sitogenetik: 46,XY[13]	—** —**	—** —**	Takip Takip		
29	2	73/E	2K2Y[400]	Normal	Sitogenetik: —*	• nuc ish 13q14(RB1×1), 13qtel(CTB-163C9×2) [44/400]	%11 oranında RB1 genini içeren 13q14 bölgesinin delesyonu	Takip		

Olgu No	Evresi	Yaş / Cinsiyet	MDM2 abnormalitesi açısından FISH sonucu	MDM2 abnormalitesi açısından FISH yorumu	Sitogenetik Sonucu	FISH ile belirlenen diğer abnormaliteler	FISH Yorumu	Karar	Uygulanan tedavi	Tedaviye yanıt
30	4	59/E	2K2Y[400]	Normal	1.Sitogenetik: 46,XY, del(20)(q12)[6] 2. Sitogenetik: —* 3.Sitogenetik: 46,XY, del(20) (q12)[10]/46,XY[15]	• nuc ish 13q14 (RB1×1), 13qtel(CTB- 163C9×2)[192/400] —** —**	• %48 oranında RB1 genini içeren 13q14 bölgesinin delesyonu —** —**	Tedavi Progresyon Takip	FC+Allojenik K.i.N 6 kür R-FC	 Takip
31	1	60/E	2K2Y[400]	Normal	1.Sitogenetik: 46,XY[7] 2.Sitogenetik: —*	• nuc ish 11q22.3 (ATM×1), D11Z1×2 [360/400] • nuc ish 13q14 (RB1×1), 13qtel(CTB- 163C9×2)[76/400] —**	• %90 oranında ATM genini içeren 11q22.3 bölgesinin delesyonu • %19 oranında RB1 genini içeren 13q14 bölgesinin delesyonu —**	Takip Relaps	 6 kür R-FC	 Takip dışı
32	1	62/E	3K3Y [200/400]	%50 oranında 12. kromozomun trizomisi	1.Sitogenetik: —* 2.Sitogenetik:46,XY[14]	• nuc ish 13q14 (RB1×1), 13qtel(CTB- 163C9×2)[36/400], • nuc ish17p13.1 (TP53×1), D17Z1×2 [36/400], • nuc ish (12p11.1- q11.1×3) [260/400] —*	• %9 oranında RB1 genini içeren 13q14 bölgesinin delesyonu • %9 oranında p53 genini içeren 17p13.1 bölgesinin delesyonu • %65 oranında 12. kromozomun trizomisi —**	Tedavi Remisyon	6 kür R-FC	Remisyon

Olgu No	Evresi	Yaş / Cinsiyet	MDM2 abnormalitesi açısından FISH sonucu	MDM2 abnormalitesi açısından FISH yorumu	Sitogenetik Sonucu	FISH ile belirlenen diğer abnormaliteler	FISH Yorumu	Karar	Uygulanan tedavi	Tedaviye yanıt
33	0	68/E	2K2Y[400]	Normal	46,XY[6]	—**	—**	Takip		
34	0	66/K	2K2Y[400]	Normal	46,XY[14]	—**	—**	Takip		
35	2	59/E	2K2Y[400]	Normal	46,XY[18]	—**	—**	Takip		
36	4	75/E	2K2Y[400]	Normal	Sitogenetik: —*	—**	—**	Tedavi	6 kür HDMP	EX
37	0	54/E	2K2Y[400]	Normal	46,XY, del(7)(q31), dup(12)(q21q21)[8]	• nuc ish 11q22.3 (ATM×1), D11Z1×2 [260/400]	• %65 oranında ATM genini içeren 11q22.3 bölgesinin delesyonu	Takip		
38	3	65/E	2K2Y[400]	Normal	1.Sitogenetik:46,XY[15] 2.Sitogenetik: —*	• nuc ish17p13.1 (TP53×1), D17Z1×2 [72/400] —**	• %18 oranında p53 genini içeren 17p13.1 bölgesinin delesyonu —**	Tedavi Takip	4 kür R-6 kür FC	

Olgu No	Evresi	Yaş / Cinsiyet	MDM2 abnormalitesi açısından FISH sonucu	MDM2 abnormalitesi açısından FISH yorumu	Sitogenetik Sonucu	FISH ile belirlenen diğer abnormaliteler	FISH Yorumu	Karar	Uygulanan tedavi	Tedaviye yanıt
39	4	61/E	2K2Y[400]	Normal	1.Sitogenetik: 46,XY[15] 2.Sitogenetik: —*	• nuc ish 11q22.3 (ATM×1), D11Z1×2 [60/400] • nuc ish 11q22.3 (ATM×1), D11Z1×2 [70/400] • nuc ish 13q14 (RB1×1), 13qtel (CTB-163C9×2)[40/400]	• %15 oranında ATM genini içeren 11q22.3 bölgesinin delesyonu • %17.5 oranında ATM genini içeren 11q22.3 bölgesinin delesyonu • %10 oranında RB1 genini içeren 13q14 bölgesinin delesyonu	Tedavi Relaps	8 kür FC 6 kür R-FC	 EX
40	3	60/E	3K3Y [300/400]	%75 oranında 12. kromozomun trizomisi	1.Sitogenetik: 46,XY[15] 2.Sitogenetik: —*	• nuc ish 17p13.1 (TP53×1), D17Z1×2 [80/400], • nuc ish (12p11.1-q11.1×3)[304/400]	• %20 oranında p53 genini içeren 17p13.1 bölgesinin delesyonu • %76 oranında 12. kromozomun trizomisi	Tedavi Remisyon	6-8 kür FC	 Remisyon

(—*) : Kromozom analizinde metafaz elde edilemediğinden bu olguların sitogenetik sonucu bulunmamaktadır.

(—**) : FISH istemi bulunmamaktadır.

HDMP : YÜKSEK DOZ METİLPREDNİZOL

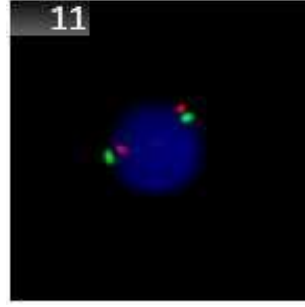
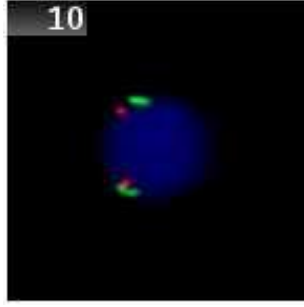
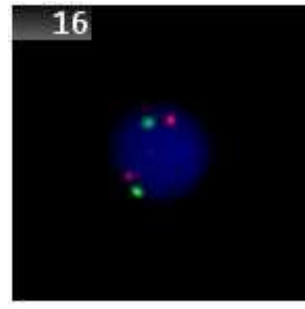
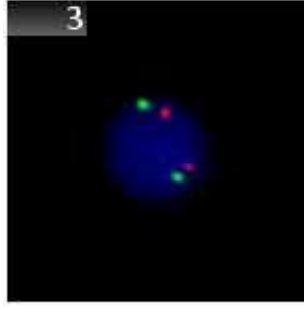
R : RUTİKSİMAB

CVP : SİKLOFOSFAMİD-VİNKRİSTİN-PREDNİZOLON

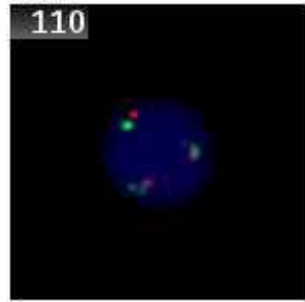
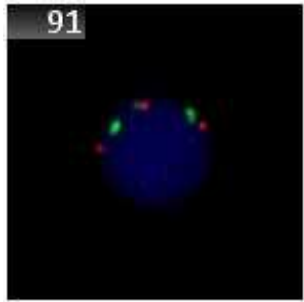
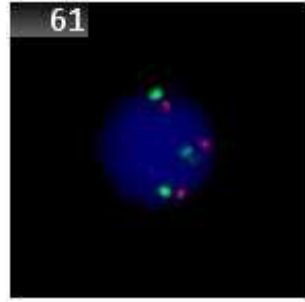
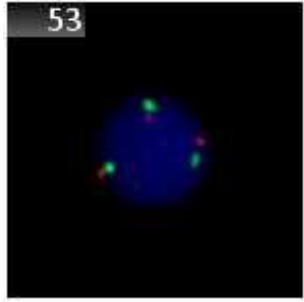
F : FLUDARABİN

FC : FLUDARABİN SİKLOFOSFAMİD

Kİİ : KEMİK İLİĞİNAKLİ



Şekil 3a. *MDM2* Genine Spesifik Prob İle Yapılan FISH Uygulamalarında Normal Sinyal Paterninin Gösterilmesi



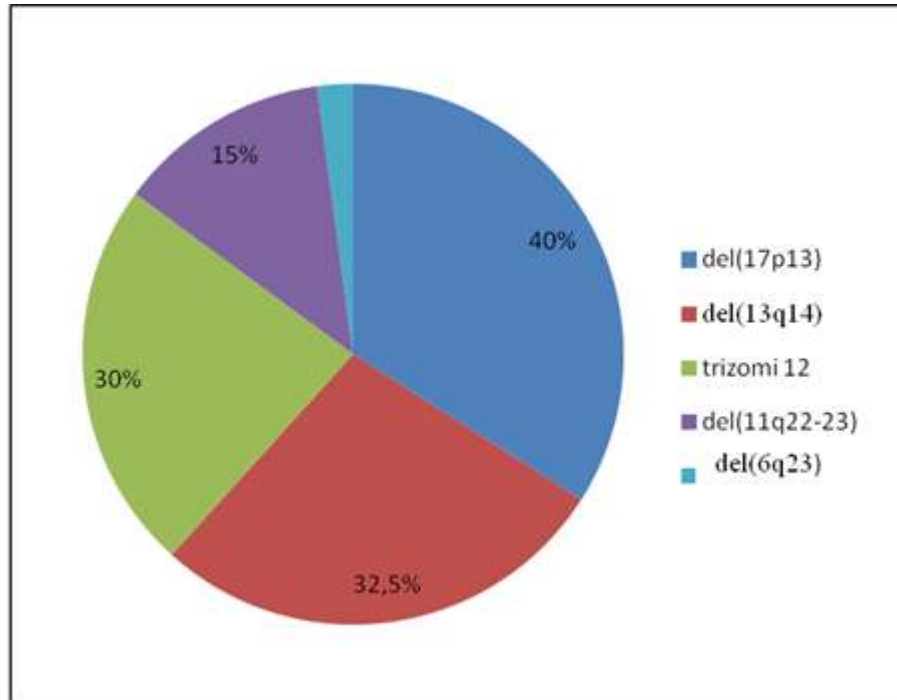


Şekil 3b. *MDM2* Genine Spesifik Prob İle Yapılan FISH Uygulamalarında Trizomi 12' ye ait Sinyal Paterninin Gösterilmesi

Hem kontrol grubunda hem de KLL hastalarında *MDM2* gen amplifikasyonunu gösteren sentromer sayısının sabit ($n=2$); *MDM2* gen lokusuna ait sinyalin 3 ve daha fazla sayıda ($n>3$) olduğu bir olguya rastlanılmamıştır.

MDM2 genine spesifik prob kullanılarak uygulanan FISH metoduyla *MDM2* amplifikasyonu negatif saptanan tez çalışmamızdaki 40 olguya uygulanan rutin FISH analizinde bu olguların 16' sında (%40) 17p13 delesyonu, 13' ünde (%32.5) 13q14 delesyonu, 12' sinde (%30) trizomi 12, 6' sında (%15)' inde 11q22.3 delesyonu ve 1' inde (%2.5) 6q23 delesyonu gözlenmiştir. (Grafik 1)

Grafik 1. 40 KLL olgusuna ait rutin FISH analizi ile saptanan kromozomal abnormaliteler



MDM2 gen amplifikasyonunu belirlemek üzere yapılan FISH çalışmasında 12 olguda trizomi 12 saptanmıştır. Bu olguların 6' sı izole trizomi 12 olup erken evre hastalardı. 17p13 delesyonu ile birlikte gösteren 4 trizomi 12 'li hasta ve 1 13q14 delesyonlu hasta tedavi endikasyonu olan hastalardı. (Tablo 6)

Tablo 6. FISH analizi ile saptanan trizomi 12' li olgular ve klinik durum

Olgu	İzole trizomi 12	Trizomi12+d el(13q14)	Trizomi12+ del(17p13)	Trizomi12+del (13q14)+del(17p13)	Klinik Durum
2		pozitif			Takip
9	pozitif				Takip Dışı
10	pozitif				Takip
11	pozitif				Takip Dışı
13			pozitif		Tedavi Devam
14	pozitif				Takip
22			pozitif		Tedavi /Remisyon
24			pozitif		Tedavi /Remisyon
25	pozitif				Takip Dışı
27	pozitif				Takip Dışı
32				pozitif	Tedavi /Remisyon
40			pozitif		Tedavi /Remisyon

TARTIŞMA

KLL, erişkinlerde %25 oranla en sık gözlenen lösemi tipi olup batı toplumlarında yıllık görülme sıklığı 4/100.000' dir (17). Tanı anındaki ortalama yaş 65 olmakla birlikte, sıklığı yaşla artmakta ve 70 yaş üstü nüfus grubunda 50/100.000' e ulaşmaktadır. Erkeklerde kadınlara göre iki kat daha sıklıkta görülmektedir. (18). Tanı anında hastaların %75' i erken evre olup %25' i ileri evredir. Ortalama yaşam süresi evre arttıkça azalır. Erken evrede ortalama yaşam süresi 12 yıl iken, ileri evrede ortalama yaşam süresi 1,5 yıldır. Erken evre bazı hastalar tedavi edilmeksizin yıllarca yaşayabilirler (147). Çalışma grubumuzu oluşturan 40 KLL olgusunun tanı anındaki yaş ortalaması 62.7 olarak belirlenmiş olup, bu değer literatürle uyumlu bulunmuştur. 40 olgumuzda kadın:erkek oranı 1:3 olarak bulunmuş olup, bu bulgu KLL' nin erkeklerde daha fazla sıklıkta gözlemlendiğini desteklemektedir. Tanı anındaki evrelerine baktığımızda da, daha önceki çalışmalara paralel olarak; 40 olgunun %75' i erken evre olarak belirlenmiştir. İleri evre olarak belirlenen 10 olgudan 4'ünün (%40'nın) yaşamını yitirmiş olması ileri evrede tanı konulan olgularda ortalama yaşam süresinin 1,5-2 yıl olduğunu doğrulamaktadır.

Kontrollü olarak yapılan etiyolojik çalışmalarda KLL' nin gelişiminde kimyasalların, radyasyonun, kötü beslenmenin, virus infeksiyonların ve otoimmün hastalıkların önemli bir risk oluşturmaları bulunmasına rağmen bugüne kadar bunların KLL ile kesin olarak ilişkisi gösterilememiştir (19). Diğer taraftan KLL' ye yakalanan kişilerin birinci ve ikinci derecede akrabalarında da bu löseminin gelişme ihtimalinin yüksek olduğunun bilinmesi genetik bir faktöründe etkin olduğunu düşündürmektedir (22,23). Literatürde KLL' ye yakalanan ailelere ait detaylı çalışmalar olmasına rağmen bu kişilerde KLL' ye spesifik kromozomal düzeyde bir bozukluk bulunamamıştır ve genetik geçiş mekanizmasının moleküler patogenezi tam olarak bilinmemektedir (22). Bunun en büyük nedeni hem KLL hücrelerinin metafaz evresinde saptanabilmesindeki zorluklar, hem de KLL' ye özgü genetik bir bozukluğun görülmemesidir (14,32,101). Bununla birlikte, KLL hastalarının %30-%50' sinde değişik sitogenetik abnormaliteler belirlenmiştir (14). FISH yöntemiyle KLL' de en sık gözlenen abnormaliteler 13q14 delesyonu (%51), 11q22.3 delesyonu (%17-20), trizomi 12 (%15), 17p13 delesyonu (%7), 6q23 delesyonu (%7) ve t(14;19) translokasyonudur (%1-2) (101,102). Bizim çalışma grubumuzda ve 20 KML tanılı kontrol grubunda 12 numaralı kromozomda lokalize *MDM2* gen amplifikasyonuna bu gene spesifik prob kullanılarak FISH yöntemi ile bakıldığında *MDM2* geninde amplifikasyon gözlenmezken, KLL tanılı 40 olgunun 12' sinde %30 oranında trizomi 12 belirlenmiştir. Bu oranın daha önceki çalışmalardan daha yüksek olması; kullanılan probun gene spesifik olması nedeni ile yanlış negatifliği ortadan kaldırdığı düşüncesindeyiz. Diğer taraftan çalışma grubumuzu oluşturan olgular,

daha önce rutin olarak konvansiyonel sitogenetik ve FISH yöntemleri ile raporlandırılmış olgular olup, bu olgularda rutin FISH testlerinin uygulanması sonucunda, en sık 17p13 delesyonu (%40) görülmüş olup sonra sırasıyla 13q14 delesyonu (%32.5), trizomi 12 (%30), 11q22.3 delesyonu (%15) ve 6q23 delesyonu (%2.5) görülmüştür. Daha önceki çalışmalarda ortalama %7' lik bir oranla gözlenen 17p13 delesyonunun bizim hasta grubumuzda en sık gözlenen anomali olmasının sebebi kullanılan probların farklılığına, laboratuvarlar arası cut-off değerlerinin değişkenliğine ve popülasyonların heterojenitesine bağlı olabilir. Döhner H. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, bu kromozomal abnormalitelerle direkt olarak prognozunu ilişkili olduğu gösterilmiştir. Örneğin 17p ve 11q delesyonlu hastaların prognozunu, karyotipi normal olan hastalardan daha kötü, tek başına 13q delesyonu olan hastaların ise prognozunu daha yavaş seyirli ve daha uzun sağkalım süresi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (101). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde izole 13q delesyonu olan hastaların prognozunu daha yavaş ilerleyen erken evre hastalar olduğu ve bu hastaların tedavi endikasyonlarının olmadığı gözlenmiştir. Yine benzer şekilde 17p13.1 ve 11q22.3 delesyonu olan hastaların prognozunu kötü olduğu belirlenmiş ve bu hastalar için tedavi endikasyonu gözlenmiştir.

KLL hücrelerinin büyük bir çoğunluğu proliferasyon kapasiteleri olmadığından hücre siklusunun G0/G1 evresinde tutuklu kalırlar. Sonuç olarak KLL hastalığı B hücrelerinin fazla çoğalmasından değil apoptozun az olmasından kaynaklanmaktadır (137). Apoptozun mekanizmasında bir tümör süpresör gen olan *p53* geni rol oynamaktadır (103,104). *P53* proteini bir transkripsiyon faktörü olarak DNA'ya bağlanma, hücre döngüsünün düzenlenmesi, DNA tamiri, farklılaşma, genomik plastisite ve apoptoz gibi birçok farklı fonksiyona sahiptir (18,23,106).

M. Solenthaler ve arkadaşlarının *MDM2* geninin overekspresyonu ile trizomi 12 arasındaki ilişkiyi qRT-PCR yöntemi ile gösterdikleri bir çalışmada, lösemik fazdaki MCL'li 21 hastanın sadece 2'sinde trizomi / tetrazomi 12 saptanırken, 7 hastanın 6'sında 12. kromozomun sayısal artışı olmaksızın *MDM2* geninin overekspresyonu gözlenmiştir. Bu 7 hastanın sadece 1 tanesinde trizomi 12 saptanmıştır (148). Yine benzer şekilde Manal O. ve arkadaşlarının 82 Multipl Myelom hastası üzerinde FISH yöntemi kullanarak yaptıkları bir çalışmada, 82 olgunun 48'inde trizomi 12 gözlenmiş olup, hem trizomi 12 gözlenen hem de karyotipi normal olan olgularda % 8 oranında *MDM2* gen amplifikasyonunun belirlenmesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (149). Bizim çalışmamızda da %30 oranında trizomi12 saptanmışken *MDM2* geninin amplifikasyonu saptanmamıştır. Buda bize *MDM2* gen amplifikasyonu ile 12. kromozomun sayısal artışı arasında ilişki olmadığını göstermektedir.

p53'ün stabilizasyonunun düzenlenmesinde *MDM2* (MIM 164785, *MDM2* veya *HDM2*) adlı bir protein rol oynamaktadır. *MDM2*, *p53*'ün amino ucuna bağlanarak hem onun transkripsiyonel etkinliğini baskılamakta, hem de proteozomal komplekslere yönlendirerek burada degradasyonunu sağlayan ubiquitin ligaz aktivitesi göstermektedir (107). İlginç olarak; *p53*, *MDM2* geninin de transkripsiyonunu aktive etmektedir (108). Hem ekzojenik hem endojenik etkenlerle hücrenin strese maruz kaldığı durumlarda *MDM2*'nin *p53*'e bağlanma yerinde asetilasyon ve fosforilasyon nedeniyle yapısal değişiklik oluşur. Bu yüzden *MDM2*

proteini p53' ü bağlayamaz ve serbest kalan p53 transkripsiyonel aktivitesini göstererek G1 ve G2 kontrol noktalarında hücre siklusunun durdurulmasına ve BAX geni aktivasyonu ile apoptoza neden olur (109). Ancak özellikle onkojenik stimulus varlığında MDM2 etkisini, p53' e bağımlı olmayan yolla da gösterir. Hücre döngüsünün G1/S geçişinden sorumlu olan E2F (Hücre döngüsünde S evresi genlerinin transkripsiyonunu sağlar) aktivasyonunu, p14ARF' nin (MDM2' ya bağlanarak p53' ün aktivasyonuna katkı sağlayan tümör supresör gen) inaktivasyonunu yapar. İnaktive olan p14ARF hücre çekirdeğinde MDM2' yi bağlayamaz ve sitoplazmaya çıkmasına engel olamaz. Sitoplazmaya çıkan MDM2 p53' e bağlanarak aktivitesini inhibe eder (110).

MDM2 ile ilgili Watanabe T. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, MDM2 geninin KLL' li olguların %47' sinde overekspresyonu saptanmış olup bu ekspresyonun KLL' de prognozu kötü yönde etkilediği gösterilmiştir. Bu çalışmada 17 KLL olgusunun periferik kan lenfositleri Noutthern Blot tekniği ile analiz edilmiş olup, erken evre 8 hastanın 1' inde (%12.5) ve ileri evre 9 hastanın 7' sinde (%77.7) MDM2 geninin overekspresyonu gözlenmiştir (122). KLL ile ilgili M James B. Johnston ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise KLL' li hastalarda bu genin p53' ü bloke ettiği gösterilmiş ve bu yolla programlanmış hücre ölümünü engelleyip, ilaç direnci oluşturduğu savunulmuştur (11). KLL tedavisine yönelik yapılan Kensuke Kojima ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise, KLL' de P53-MDM2 bağlantısını engelleyerek p53' e aktivasyon kazandıran 'nutlins' içeren ilaçlar geliştirilmeye başlandığı gösterilmiştir (120). KLL' de MDM2 geninde ekspresyon artışının gösterilmesine karşın bugüne kadar MDM2 geninin amplifikasyonunun olup-olmadığını gösteren bir çalışmaya rastlanılmadığından, ilk kez bu çalışmada KLL tanılı 40 olguda MDM2 genine spesifik prob kullanılarak FISH yöntemiyle çalışılmış ve her olguda 400 hücre değerlendirilmiştir. Bu olgularda MDM2 gen amplifikasyonu belirlenmemiştir. Çalışmamızdaki 40 olgudan 30'unun (% 75) tanı anında erken evre olup, tedavi endikasyonu olmayan KLL olgularının olması; MDM2 gen amplifikasyonunun negatif olduğu durumda iyi progresif faktör olduğunu göstermektedir. Bu % 75 oranındaki erken tanı ve tedavi endikasyonu olmayan hastaların takiplerinde tedavi endikasyonu gelişmesi durumunda MDM2 gen ekspresyonunun tekrar bakılması MDM2-KLL ilişkisini göstermede daha faydalı olacaktır. İleri evre olan 10 (%25) hastada MDM2 gen amplifikasyonunun görülmemesi, 10 olgunun 7' sinde (% 70) 17p13 lokusunda delesyonun belirlenmiş olmasından dolayı, MDM2 geni overekspresyonu olsa bile 17p13 delesyonu olan KLL olgularında p53 ve MDM2 proteini arasındaki regülasyonunun MDM2 gen amplifikasyonu olmadan gerçekleşebileceğini düşündürmüştür. Kullanılan prob ile MDM2 gen amplifikasyonunun saptanmamasına rağmen 12 olguda (%30 oranında) trizomi 12' nin belirlenmesine olanak sağlamıştır. Bu durum uygulamalarında bu probun kullanılarak hem amplifikasyonu hem de 12. kromozomdaki sayısal artışları da gösterebilmesi açısından tercih edilmesi gereken bir prob olduğunu göstermektedir. Daha önceki yapılan çalışmalarda SNP 309 G/G genotipine sahip ve dolayısıyla yüksek düzeyde MDM2 ekspresyonunu içeren KLL hücrelerinin apoptoza dirençli ve ileri evre hastalık özelliği gösteren hücreler olduğu gösterilmiştir (117-119). Ayrıca MDM2 genin promotor bölgesindeki SNP' lerin daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olması nedeniyle, bir sonraki basamak olarak

bu çalışmada gen amplifikasyonu olmayan KLL olgularında *MDM2* gen ekspresyonuna ve özellikle ileri evredeki olgularda *MDM2* geninin 309. pozisyonundaki G/G genotipine sahip olup olmadıklarına da bakılması gerektiği düşüncesindeyiz. Daha yüksek sayıda hasta grubunda bu çalışmanın yapılması ve başlangıçta tedavi endikasyonu olmayan hastaların takiplerinde tedavi endikasyonu geliştiğinde bu amplifikasyona tekrar bakılması ile *MDM2* KLL ilişkisinin gösterilebileceği ve ayrıca prognoz ve tedavi direnci üzerine olan etkisi hakkında daha fazla bilgi edinilebileceği inancındayız.

SONUÇLAR

KLL' de *MDM2* geninin amplifikasyonunu gösterebilmek amacıyla yapılan bu çalışmada *MDM2* genine spesifik prob kullanılarak FISH yöntemi uygulanan 40 KLL ve kontrol amaçlı 20 KML olgusunun hiçbirinde *MDM2* gen amplifikasyonu gözlenmezken; 40 KLL olgusunun 12' sinde (%30 oranında) bu genin lokalize olduğu 12. kromozomun trizomisi belirlenmiştir. KLL' de en sık görülen bir kromozomal abnormalite olan 12. kromozomun trizomisinin gösterilmesi ancak *MDM2* gen amplifikasyonunun belirlenmemesi; hasta grubunun hastalığın erken evre döneminde olması ile ilişkilendirilmiştir.

KLL olgularında FISH yöntemi ile *MDM2* gen amplifikasyonunun gözlenmemesi nedeni ile bu olgularda mRNA düzeyinde overekspresyon olup olmadığına bakılmasına ve olguların takip edilerek evresi ilerleyen olguların *MDM2* gen amplifikasyonu için yeniden değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Ayrıca gen amplifikasyonu olmayan özellikle ileri evredeki bu olgularda *MDM2* geninin 309. pozisyonundaki G/G genotipine sahip olup olmadıklarına da bakılması gerektiği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Kokhaei P, Palma M, Mellstedt H, Choudhury A. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol.* 2005;16 Suppl 2:ii113-23.
2. Ghia P, Ferreri AM, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007 Dec;64(3):234-46. Epub 2007 Jun 1.
3. Rossmann ED, Lewin N, Jeddi-Tehrani M, Osterborg A, Mellstedt H. Intracellular T cell cytokines in patients with B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). *Eur J Haematol.* 2002 May;68(5):299-306.
4. Podhorecka M, Dmoszynska A, Rolinski J. Intracellular IFN-gamma expression by CD3+/CD8+ cell subset in B-CLL patients correlates with stage of the disease. *Eur J Haematol.* 2004 Jul;73(1):29-35.
5. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*; 163-83, 2004.
6. The French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. Effects of chlorambucil and therapeutic decision in initial forms of chronic lymphocytic leukemia (stage A): results of a randomized clinical trial on 612 patients. *Blood* 1990; 75:1414-1421.
7. Rozman C, Montserrat E. Current concepts: chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 1995; 333(16): 1052-1057.
8. Kalil N, Cheson B. Chronic lymphocytic leukemia. *The Oncologist.* 1999; 4(5): 352-369.
9. Pamuk ON, Pamuk GE, Soysal T, et al. An overview of young CLL patients: a single center experience from Turkey. *Haematologia.* 2002; 31(4): 303-311.
10. Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patient with CLL. *Blood* ;103 (4), 1202-1210, 2004.
11. Johnston JB, Daeninck P, Verburg L, et al *P53* MDM-2, BAX and BCL-2 and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk lymphoma* 1997;26:435-49.

12. Watanebe T, Hotta T, Ichikawa A, The *MDM2* oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low-grade lymphoma of B-cell origin. *Blood* 1994;84:3158-65.
13. Fox JL, Hsu PH, Legator MS, Morrison LE, Seelig SA. Fluorescence in situ hybridization: powerful molecular tool for cancer prognosis. *Clin Chem.* 1995 Nov;41(11):1554-9.
14. Glassman A, Hayes KJ. The value of fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*; 158 (1), 88-91, 2005.
15. Hamblin T. Histological aspects of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2000 Dec; 111 (4) : 1023-34.
16. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood.* 1996 Jun 15;87(12):4990-7.
17. Swerdlow SH., et al., WHO Classification of hematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon, France: World Health Organization; 2008.- Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005;352(8):804-815.
18. Sellmann L, Carpinteiro A, Nüchel H, Scholtysik R, Siemer D, Klein-Hippass L, Kube D, Dürig J, Dührsen U, Stanelle J, Küppers R. p53 protein expression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2012 Feb 13.
19. Faguet GB. Chronic Lymphocytic Leukemia: an updated review. *J Clin Oncol* 1994;12:1974-90.
20. Bianco E, Marcucci F, Mele A, Musto P, Cotichini R, Sanpaolo MG, Iannitto E, De Renzo A, Martino B, Specchia G, Montanaro M, Barbui AM, Nieddu R, Pagano L, Rapaicetta M, Franceschi S, Mandelli F, Pulsoni A; Italian Multi-Center case-control study. Prevalence of hepatitis C virus infection in lymphoproliferative diseases other than B-cell non-Hodgkin's lymphoma, and in myeloproliferative diseases: an Italian Multi-Center case-control study. *Haematologica.* 2004 Jan;89(1):70-6.
21. Houlston RS, Catovsky D, Yuille MR. Genetic susceptibility to chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2002 Jun;16(6):1008-14.
22. Caporaso N, Goldin L, Plass C, Calin G, Marti G, Bauer S, Raveche E, McMaster ML, Ng D, Landgren O, Slager S. Chronic lymphocytic leukaemia genetics overview. *Br J Haematol.* 2007 Dec;139(5):630-4.

23. Capalbo S, Trerotoli P, Ciancio A, Battista C, Serio G, Liso V. Increased risk of lymphoproliferative disorders in relatives of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: relevance of the degree of familial linkage. *Eur J Haematol*. 2000 Aug;65(2):114-7.
24. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ; International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5446-56. doi: 10.1182/blood-2007-06-093906. Epub 2008 Jan 23.
25. Abdel-Ghafar AA, El Din El Telbany MA, Mahmoud HM, El-Sakhawy YN. Immunophenotyping of chronic B-cell neoplasms: flow cytometry versus immunohistochemistry. *Hematol Rep*. 2012 Jan 2;4(1).
26. Tsai HT, Cross AJ, Graubard BI, Oken M, Schatzkin A, Caporaso NE. Dietary factors and risk of chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma: a pooled analysis of two prospective studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Oct;19(10):2680-4.
27. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981; 48: 198-206.
28. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*: 1975; 46: 19-34.
29. Mozaheb Z, Hasanzadeh NazarAbadi MH, Aghaee MA. Chronic lymphocytic leukemia and prognostic factors. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(7):3009-13.
30. Montserrat E; chronic lymphocytic leukemia : New prognostic marker in CLL. *Hematology Am soc Hematol Educ program* 2006;279-84.
31. Oscier D, Fegan C, Hillman P, et al. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J of Haematol*. 2004; 125(3): 294-317.
32. Montillo M, Hamblin T, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* 2005; 90(3): 391-399.
33. Buhl AM, James DF, Neuberg D, Jain S, Rassenti LZ, Kipps TJ. Analysis of CLLU1 expression levels before and after therapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*. 2011 May;86(5):405-11.

34. Motycková M, Zák P, Vroblová V, Andrýs C, Belada D, Malý J, Smolej L. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Vnitr Lek*. 2011 Oct;57(10):847-57.
35. Asaad NY, Abd El-Wahed MM, Dawoud MM. Diagnosis and prognosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (B-CLL/SLL) and mantle cell lymphoma (MCL). *J Egypt Natl Canc Inst*. 2005 Dec;17(4):279-90.
36. Meuleman N, Stamatopoulos B, Dejeneffe M, El Housni H, Lagneaux L, Bron D. Doubling time of soluble CD23: a powerful prognostic factor for newly diagnosed and untreated stage A chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia*. 2008 Oct;22(10):1882-90. doi: 10.1038/leu.2008.190. Epub 2008 Jul 17
37. Lee JS, Dixon DO, Kantarjian HM et al. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood* 1987;69:929-36.
38. Durig J, Naschar M, Schmucker U et al. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002;16:30-5.
39. Schroers R, Griesinger F, Trumper L et al. Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005;19:750.
40. Heintel D, Schwarzingen I, Chizalli-Bonfadin C et al. Association of CD38 antigen expression with other prognostic parameters in early stages of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk lymphoma* 2001;42:1315-21.
41. Magnac C, Porcher R, Davi F et al. Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. *Leukemia* 2003;17:133-7.
42. Pan L, Beveley PCL & Isaacson PG. Lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes and proliferative activity of lymphoid cells-an immunocytochemical study. *Clin Exp Immunol*; 86 (2), 240-245, 1991.
43. Bouafia F, Draï J, Bienvenu J, Thieblemont C, Espinouse D, Salles G, Coiffier B. Proliferative and prognostic values of serum LDH isoenzymes in patients with haematopoietic malignancies. *Bull Cancer*; 91(7-8) : E229-40, 2004.
44. Weinberg JB, Volkheimer 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.

45. Sarfati M, Chevret S, Chastang C et al. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1996;88:4259-64.
46. Saka B, Aktan M, Sami U et al. Prognostic importance of soluble CD23 in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin lam haematol* 2006;28:30-5.
47. Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 100 (4); 1410-1416, 2002.
48. Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Levey RH, Schlossman SF. Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of Tcell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 77 (3): 1588-1592, 1980.
49. Deaglio S, Dianzani U, Horenstein AL, Fernandez JE, van Kooten C, Bragardo M, Funaro A, Garbarino G, Di Virgillio F, Banchereau J, Mlvasi F. Human CD38 ligand. A 120-KDA protein predominantly expressed on endothelial cells. *J Immunol*; 156 (2): 727-734, 1996.
50. Wolowiec D, Ciszak L, Kosmaczewska A, et al. Cell cycle regulatory proteins and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2001;86:1296-304.
51. Mainou-Fowler T, Dignum HM, Proctor SJ, Summerfield GP. The prognostic value of CD38 expression and its quantification in B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Leuk Lymphoma*. 2004 Mar;45(3):455-62.
52. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marcé S, López-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003 May 1;348(18):1764-75.
53. 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 Feb 1;99(3):1023-9.
54. Hamblin TJ. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007 Sep;20(3):455-68.
55. Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, Lerner S, Kantarjian HM, Albitar M. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001 Jul 1;98(1):181-6.

56. Bottini N, Stefanini L, Williams S, Alonso A, Jascur T, Abraham RT, Couture C, Mustelin T. Activation of ZAP-70 through specific dephosphorylation at the inhibitory Tyr-292 by the low molecular weight phosphotyrosine phosphatase (LMPTP). *J Biol Chem.* 2002 Jul 5;277(27):24220-4. Epub 2002 Apr 25.
57. Saito T, Matsuda Y, Ito H, Fusaki N, Hori T, Yamamoto T. Localization of Zap70, the gene for a T cell-specific protein tyrosine kinase, to mouse and rat chromosomes by fluorescence in situ hybridization and molecular genetic linkage analyses. *Mamm Genome.* 1997 Jan;8(1):45-6.
58. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell.* 1992 Nov 13;71(4):649-62.
59. Carreras J, Villamor N, Colomo L, Moreno C, Ramón y Cajal S, Crespo M, Tort F, Bosch F, López-Guillermo A, Colomer D, Montserrat E, Campo E. Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in B-cell lymphoid neoplasms. *J Pathol.* 2005 Mar;205(4):507-13.
60. Nolz JC, Tschumper RC, Pittner BT, Darce JR, Kay NE, Jelinek DF. ZAP-70 is expressed by a subset of normal human B-lymphocytes displaying an activated phenotype. *Leukemia.* 2005 Jun;19(6):1018-24.
61. Chan AC, Irving BA, Fraser JD, Weiss A. The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Oct 15;88(20):9166-70.
62. Latour S, Veillette A. Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling. *Curr Opin Immunol.* 2001 Jun;13(3):299-306.-(Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell.* 1992 Nov 13;71(4):649-62.
63. Crespo M, Villamor N, Gine E, Muntanola A, Colomer D, Marafioti T, Jones M, Camos M, Campo E, Montserrat E, Bosch E. ZAP-70 expression in normal pro/pre B cells, mature B cells, and in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res.* 12 (3 Pt 1): 726-34, 2006.
64. Djeu JY, Jiang K, Wei S. A view to a kill: signals triggering cytotoxicity. *Clin Cancer Res.* 2002 Mar;8(3):636-40.
65. Chen L, Widhoph G, Huynh L, Rassenti L, Kanti R, Weiss A and Kips TJ. Expression of ZAP70 is associated with increased B cell receptor singnaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002; 100: 4609-4614.

66. Kong GH, Bu JY, Kurosaki T, Shaw AS, Chan AC. Reconstitution of Syk function by the ZAP70 protein tyrosine kinase. *Immunity*.1995; 2: 485-492.
67. Del Principe M, Del Poeta G, Buccisano F, Maurillo L, Venditti A, Zuchetto A, Marini R, Niscola P, Consalvo MAI, Mazzone C, Ottaviani L, Panetta P, Bruno A, Bomben R, Suppo G, Gegan M, Gattei V, Fabritiis P, Cantonetti M, Lo Coco F, Del Principe D, Amadori S. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 108 (3): 853-861, 2006.
68. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, Hamblin TJ, Staudt LM, Oscier DG. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2004 Jan 10;363(9403):105-11.
69. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. 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.
70. Kipps TJ. Signal transduction pathways and mechanisms of apoptosis in CLL b lymphocytes: their role in CLL pathogenesis. *Hematol Cell Ther* 39. 1997; (Suppl 1):17-27.
71. Patel DV, Rai KR. Chronic Lymphocytic Leukemia. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al (eds): *Hematology basic principles and practice*, Elsevier, USA, 2005; 1437-154.
72. Schlette E, Fu K, Medeiros LJ. CD23 expression in mantle cell lymphoma: clinicopathologic features of 18 cases. *Am J Clin Pathol*. 2003;120(5):760-6.
73. Cheuk W, Wong KO, Wong CS, Chan JK. Consistent immunostaining for cyclin D1 can be achieved on a routine basis using a newly available rabbit monoclonal antibody. *Am J Surg Pathol*. 2004;28(6):801-7.
74. Sun T, Nordberg ML, Cotelingam JD, Veillon DM, Ryder J. Related Articles, Links Fluorescence in situ hybridization: method of choice for a definitive diagnosis of mantle cell lymphoma. *Am J Hematol*. 2003;74(1):78-84.
75. Robertson LE, Plunkett W, McConnell K, Keating MJ, McDonnell TJBcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia*. 1996 Mar;10(3):456-9.
76. O’Gorman DM, Cotter TG. Molecular signals in anti-apoptotic survival pathways. *Leukemia*. 2001;15(1):21-34.
77. Gallego A., Vargas J.A. , Castejon R, Citores M.J, Romero Y, Millan I, and Durantez A. Production of Intracellular IL-2, TNF- α , and IFN- γ by T cells in B-CLL. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*. 2003; 56B: 23-29.

78. Meinhardt G, Wendtner CM, Hallek M. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival. *J Mol Med.* 1999;77(2):282-93. Review.
79. Panayiotidis P, Ganeshaguru K, Jabbar SA, Hoffbrand AV. Alpha-interferon (alpha-IFN) protects B-chronic lymphocytic leukaemia cells from apoptotic cell death in vitro. *Br J Haematol.* 1994;86(1): 169-73.
80. McSweeney EN, Giles FJ, Worman CP, Jewel AP, Tsakona CP, Hoffbrand AV, Mehta AB, Newland AC, Cawley JC, Galvani D, et al. Recombinant interferon alfa 2a in the treatment of patients with early stage B chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 1993;85(1):77-83.
81. Barragan M, Bellosillo B, Campas C, Colomer D, Pons G, Gil J. Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* 2002;99(8):2969-76.
82. Barragan M, Campas C, Bellosillo B, Gil J. Protein kinases in the regulation of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2003;44 (11): 1865-70.
83. Furman RR, Asgary Z, Mascarenhas JO, Liou HC, Schattner EJ. Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol.* 2000;164(4):2200-6.
84. Rozman C, Hernandez-Nieto L, Montserrat E, Bragues R. Prognostic significance of bonemarrow patterns in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol;* 47(4); 529-537, 1981.
85. Schade U, Bock O, Vornhusen S, Jager A, Büsche G, Lehmann U, Kreipe H. Bone marrow infiltration pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia is related to immunoglobulin heavy-chain variable region mutation status and expression of 70-kd zeta-associated protein (ZAP-70). *Hum Pathol;* 37 (9): 1153-1161, 2006.
86. Montserrat E, Rozman C: Bone marrow biopsy in chronic leukemia: a review of its prognostic importance. *Blood Cells.* 1987; 12: 315-326.
87. Rozman C, Montserrat E, Rodríguez-Fernández JM, Ayats R, Vallespi T, Parody R, Ríos A, Prados D, Morey M, Gomis F, et al. Bone marrow histologic pattern--the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood.* 1984 Sep;64(3):642-8.
88. Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 1987 Dec 1;60(11):2712-6.

89. Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Viñolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol.* 1986 Mar;62(3):567-75.
90. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *The Onco.* 2004; 9 (suppl 1): 2-10.
91. Fons P, Herault JP, Tuyaret J, et al. VEGF-R2 and Neuropilin-1 are involved in VEGF-A induced differentiation of human bone marrow progenitor cells. *J Cell Physiol.* 2004; 200(3): 351-359.
92. Fiedler W, Graeven U, Ergun S, et al. Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. *Blood.* 1997; 89(6): 1870-1875.
93. Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2000; 96(6): 2240-2245.
94. Peterson L, Kini AR. Angiogenesis is increased in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2001; 97(8): 2529.
95. Kini AR, Kay NE, Peterson LC. Increased bone marrow angiogenesis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2000; 14(8): 1414-1418.
96. Molica S, Vacca A, Ribatti D, et al. Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002; 100(9): 3344-3351.
97. Chen H, Treweek AT, West DC, et al. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* 2000; 96(9): 3181- 3187.
98. Molica S, Santoro R, Digiesi G, et al. Vascular endothelial growth factor isoforms 121 and 165 are expressed on B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica.* 2000; 85(10): 1106-1108.
99. Gora-Tybor J, Blonski JZ, Robak T. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) and its soluble receptors in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur Cytokine Netw.* 2005; 16(1): 41-46 (abstract).
100. Molica S, Vitelli G, Levato D, et al. Clinicoprognostic implications of increased serum levels of vascular endothelial growth factor and basic fibroblastic growth factor in early B cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Cancer.* 2002; 86(1): 31-35.

101. 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 Dec 28;343(26):1910-6.
102. Mayr C, Speicher MR, Kofler DM et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;107:742-51.
103. Mehes G. Chromosome Abnormalities with Prognostic Impact in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Pathol Oncol Res*; 11 (4):205-210, 2005.
104. Stankovic T, Hubank M, Cronin D, Stewart GS, Fletcher D, Bignell CR, Alvi AJ, Austen B, Weston vJ, Fegan C, Byrd PJ, Moss PA, Taylor AM. Microarray analysis reveals that TP53- and ATM-mutant B-CLLs share a defect in activating proapoptotic responses after DNA damage but are distinguished by major differences in activating prosurvival responses. *Blood*; 103 (1): 291-300, 2004.
105. Ripolles L, Ortega M, Ortuno F, Gonzalez A, Losada J, Ojanguren J, Soler JA, Bergua J, Coll MD, Caballin MR Genetic abnormalities and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*; 171 (1): 57-64. 2006.
106. Rufini A, Melino G. Cell death pathology: the war against cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Oct 28;414(3):445-50.
107. Masdehors P, Merle-Béral H, Maloum K, Omura S, Magdelénat H, Delic J. Deregulation of the ubiquitin system and p53 proteolysis modify the apoptotic response in B-CLL lymphocytes. *Blood*. 2000 Jul 1;96(1):269-74.
108. Pei D, Zhang Y, Zheng J. Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx. *Oncotarget*. 2012;3(3):228-35.
109. Trbusek M, Mayer J. [Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia with emphasis on cell cycle regulation and apoptosis]. *Cas Lek Cesk*. 2004;143(2):84-9.
110. Isin M, Yenerel M, Aktan M, Buyru N, Dalay N. Analysis of p53 Tumor Suppressor Pathway Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia. *DNA Cell Biol*. 2012 May;31(5):777-82. Epub 2011.
111. Freedman DA, Wu L, Levine AJ. Functions of the *MDM2* oncoprotein. *Cell Mol Life Sci*. 1999 Jan;55(1):96-107.
112. Schlott T, Reimer S, Jahns A, Ohlenbusch A, Ruschenburg I, Nagel H, Droese M. Point mutations and nucleotide insertions in the *MDM2* zinc finger structure of human tumours. *J Pathol*. 1997 May;182(1):54-61.

113. Dubs-Poterszman MC, Tocque B, Wasylyk B. *MDM2* transformation in the absence of *p53* and abrogation of the p107 G1 cell-cycle arrest. *Oncogene*. 1995 Dec 7;11(11):2445-9.
114. Marechal V, Elenbaas B, Piette J, Nicolas JC, Levine AJ. The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-*p53* complexes. *Mol Cell Biol*. 1994 Nov;14(11):7414-20.
115. Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, Pavletich NP. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*. 1996 Nov 8;274(5289):948-53.
116. Jones SN, Sands AT, Hancock AR, Vogel H, Donehower LA, Linke SP, Wahl GM, Bradley A. The tumorigenic potential and cell growth characteristics of *p53*-deficient cells are equivalent in the presence or absence of *Mdm2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26;93(24):14106-11.
117. Asslaber D, Piñón JD, Seyfried I, Desch P, Stöcher M, Tinhofer I, Egle A, Merkel O, Greil R. microRNA-34a expression correlates with *MDM2* SNP309 polymorphism and treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010 May 27;115(21):4191-7. doi: 10.1182/blood-2009-07-234823. Epub 2010 Jan 20.
118. Willander K, Ungerback J, Karlsson K, Fredrikson M, Söderkvist P, Linderholm M. *MDM2* SNP309 promoter polymorphism, an independent prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*. 2010 Sep;85(3):251-6. doi: 10.1111/j.1600-0609.2010.01470.x. Epub 2010 May 14.
119. Zhuo W, Zhang L, Ling J, Zhu B, Chen Z. *MDM2* SNP309 variation contributes to leukemia risk: meta-analyses based on 7259 subjects. *Leuk Lymphoma*. 2012 May 7.
120. Kojima K, Konopleva M, McQueen T, O'Brien S, Plunkett W, Andreeff M. *Mdm2* inhibitor Nutlin-3a induces *p53*-mediated apoptosis by transcription-dependent and transcription-independent mechanisms and may overcome Atm-mediated resistance to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006 Aug 1;108(3):993-1000. Epub 2006 Mar 16.
121. Coll-Mulet L, Iglesias-Serret D, Santidrián AF, Cosialls AM, de Frias M, Castaño E, Campàs C, Barragán M, de Sevilla AF, Domingo A, Vassilev LT, Pons G, Gil J. *MDM2* antagonists activate *p53* and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2006 May 15;107(10):4109-14. Epub 2006 Jan 26.
122. Watanabe T, Ichikawa A, Saito H, Hotta T. Overexpression of the *MDM2* oncogene in leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 1996 May;21(5-6):391-7.

123. Di Iasio MG, Norcio A, Melloni E, Zauli G. SOCS1 is significantly up-regulated in Nutlin-3-treated *p53*(wild-type) B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) samples and shows an inverse correlation with miR-155. *Invest New Drugs*. 2012 Jan 13.
124. Pettitt AR, Sherrington PD, Stewart G, Cawley JC, Taylor AM, Stankovic T. *p53* dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of *ATM* as an alternative to TP53 mutation. *Blood*. 2001 Aug 1;98(3):814-22.
125. Trbusek M, Malcikova J, Smardova J, Kuhrova V, Mentzlova D, Francova H, Bukovska S, Svitakova M, Kuglik P, Linkova V, Doubek M, Brychtova Y, Zacal J, Kujickova J, Pospisilova S, Dvorakova D, Vorlicek J, Mayer J. Inactivation of *p53* and deletion of *ATM* in B-CLL patients in relation to IgVH mutation status and previous treatment. *Leukemia*. 2006 Jun;20(6):1159-61.
126. Juliusson G, Merup M. Cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 1998 Feb;25(1):19-26.
127. Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*. 1991 Jun 14;65(6):1053-61.
128. Xiao ZX, Chen J, Levine AJ, Modjtahedi N, Xing J, Sellers WR, Livingston DM. Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature*. 1995 Jun 22;375(6533):694-8.
129. Momand J, Wu HH, Dasgupta G. MDM2-master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene*. 2000 Jan 25;242(1-2):15-29.
130. Kuhrová V, Francová H, Klimesová D, Brychtová Y, Doubek M, Trbusek M, Brejcha M, Dvoráková D, Mayer J. [Molecular genetic characterization of chronic lymphocytic leukemia aggressivity in Czech patients: a nucleotide variability of genes coding for heavy chain of immunoglobulin]. *Cas Lek Cesk*. 2006;145(11):855-8; discussion 859-60.
131. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Sep 15;94(6):1848-54.
132. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001 Dec 3;194(11):1639-47.

133. Bosch F, Muntanola A, Gine E, Carrio A, Villamor N, Moreno C, Crespo M, Montserrat E. Clinical Implications of ZAP-70 Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*; 70 (4):214-217, 2006.
134. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Sep 15;94(6):1840-7.
135. Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R, De Angeli C, Veronese A, Cavazzini F, Bardi A, Roberti MG, Tammiso E, Agostini P, Ciccone M, Della Porta M, Tieghi A, Cavazzini L, Negrini M, Castoldi G Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia*. 2004 Mar;18(3):476-83.
136. Huh YO, Lin KI, Vega F, Schlette E, Yin CC, Keating MJ, Luthra R, Medeiros LJ, Abruzzo LV. MYC translocation in chronic lymphocytic leukaemia is associated with increased prolymphocytes and a poor prognosis. *Br J Haematol*. 2008 Jul;142(1):36-44. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07152.x. Epub 2008 May 8.
137. Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, Wang HG, Zhang X, Bullrich F, Croce CM, Rai K, Hines J, Reed JC. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood*. 1998 May 1;91(9):3379-89.
138. Olsson A, diaz T, aguilar-Santelises M et al. Sensitization to TRAIL-induced apoptosis and modulation of FLICE-inhibitory protein in B chronic lymphocytic leukemia by actinomycin D. *Leudemia* 2001;407:770-6.
139. Sanz L, Garcia-Marco JA, Casanova B, de La Fuente MT, García-Gila M, Garcia-Pardo A, Silva A. Bcl-2 family gene modulation during spontaneous apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Mar 12;315(3):562-7.
140. Saxena A, Viswanathan S, Moshynska O, Tandon P, Sankaran K, Sheridan DP. 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 Jan;75(1):22-33.
141. Korz C Pscherer A, Benner A, et al. Evidence for distinct pahomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis af cell cycle and apoptosis- associates genes. *Blood* 2002;99:4554-61.
142. Durak B. Hematolojide FISH. Molekuler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Molekuler Hematoloji Kurs Kitapcığı 2005.

143. Eid OM, Eid MM, Kayed HF, Mahmoud WM, Mousafa SS, Ismail MM, Abdeen DM2. Detection of cytogenetics abnormalities in chronic lymphocytic leukemia using FISH technique and their prognostic impact. *Gulf J Oncolog.* 2014 Jan;1(15):68-75.
144. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR ve ark. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med* 2000; 343: 1750-1757.
145. Byrd JC, Rai K, Peterson BL ve ark. Addition of rituximab to fludarabine may prolong progression free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: An updated retrospective comparative analysis of CALGB912 and CALGB9011. *Blood* 2005; 105: 49-53.
146. Bosch F, Ferrer A, Villamor N, González M, Briones J, González-Barca E, Abella E, Gardella S, Escoda L, Pérez-Ceballos E, Asensi A, Sayas MJ, Font L, Altés A, Muntañola A, Bertazzoni P, Rozman M, Aymerich M, Giné E, Montserrat E. Fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia: high response rate and disease eradication. *Clin Cancer Res.* 2008 Jan 1;14(1):155-61. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1371.
147. Gribben JG. How I treat CLL up front. *Blood.* 2010 Jan 14;115(2):187-97. doi: 10.1182/blood-2009-08-207126. Epub 2009 Oct 22.
148. Solenthaler M, Matutes E, Brito-Babapulle V, Morilla R, Catovsky D. *p53* and *mdm2* in mantle cell lymphoma in leukemic phase. *Haematologica.* 2002 Nov;87(11):1141-50.
149. Elnenaei MO, Gruszka-Westwood AM, A'Hernt R, Matutes E, Sirohi B, Powles R, Catovsky D. Gene abnormalities in multiple myeloma; the relevance of TP53, MDM2, and CDKN2A. *Haematologica.* 2003 May;88(5):529-37.

EKLER

Ek-1

ÖZGEÇMİŞ

Şule Darbaş, 02.01.1985 tarihinde Isparta’ da doğdu. 1999-2002 tarihleri arasında lise öğrenimini Antalya Çağlayan Lisesi’ nde tamamladı. 2008 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’ nden mezun oldu. 2011 yılında Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Bilim Dalı’ nın açmış olduğu Yüksek Lisans programına Yüksek Lisans öğrencisi olarak başladı.