



**T.C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**B HÜCRELİ KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ  
OLGULARINDA TCL-1, MCL-1, P53, BCL-2, BAX  
EKSPRESYONLARININ VE CD20/CD52 ORANININ  
HASTALIĞIN KLİNİK PARAMETRELERİ VE  
PROGNOZU İLE OLAN İLİŞKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Nazım GÖZCÜ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Mehmet YILMAZ**

**Ağustos 2010**

**T.C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**B HÜCRELİ KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ  
OLGULARINDA TCL-1, MCL-1, P53, BCL-2, BAX  
EKSPRESYONLARININ VE CD20/CD52 ORANININ  
HASTALIĞIN KLİNİK PARAMETRELERİ VE  
PROGNOZU İLE OLAN İLİŞKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Nazım GÖZCÜ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Mehmet YILMAZ**

**Ağustos 2010**

**Bu tez Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından TF.10.05 proje numarası ile desteklenmiştir.**

## I. ÖNSÖZ

Eğitim ve hayata dair destek ve öğretilerinden dolayı eşsiz insan, tez hocam Doç.Dr. Mehmet YILMAZ'a

Tez çalışmama verdiği destekten dolayı Patoloji ABD öğretim üyelerinden Prof.Dr. İbrahim SARI'ya

Asistanlık eğitimi ve tez çalışması sürecinde sunmuş olduğu desteklerden dolayı Hematoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Mustafa PEHLİVAN ve Prof.Dr. Vahap OKAN'a

Asistanlık eğitimi sürecindeki desteklerinden dolayı Doç.Dr. Ahmet Mesut ONAT'a

Tüm güzellikleriyle Uzm. Dr. Mükerrerem KARTAL'a

İç Hastalıkları ABD'daki tüm hocalarım ve çalışma arkadaşlarıma,

Bugüne kadar vermiş oldukları yüce emek ve destekleri için sevgili annem, babam ve tüm aileme,

Güneşin ilk aydınlığı gibi hayatımı aydınlatan, varlığı mutluluk sebebim, sevgili eşim Olca'ya

Sonsuz TEŞEKKÜRLER...

Dr. Nazım GÖZCÜ

Gaziantep-2010

## II. İÇİNDEKİLER

I. ÖNSÖZ	I
II. İÇİNDEKİLER	II
III. ÖZET	IV
IV. ABSTRACT	V
V. KISALTMALAR	VI
VI. TABLO LİSTESİ	VIII
VII. ŞEKİL LİSTESİ	IX
VIII. RESİM LİSTESİ	X
<b>1.GİRİŞ VE AMAÇ</b>	1
<b>2.GENEL BİLGİLER</b>	2
2.1. Kronik Lenfositik Lösemi	2
2.1.1.Tanım	2
2.1.2. Epidemiyoloji ve Etiyoloji	2
2.1.3. Patogenez	2
2.1.3.1. B Lenfosit Yapısı ve Olgunlaşma Süreci	2
2.1.3.2. KLL’de B Hücre Morfolojisi ve KLL Biyolojisi	3
2.1.4. Laboratuvar Bulguları	5
2.1.5. Klinik Bulgular	5
2.1.6. Tanı	6
2.1.7. Ayırıcı Tanı	7
2.1.8. Evreleme	8
2.1.9. Sitogenetik İnceleme	10
2.1.10. Komplikasyonlar	11
2.1.11. Prognostik faktörler	11
2.1.12.Tedavi	14
2.1.12.1.Tedavi endikasyonları ve Tedavi Yanıt Değerlendirmesi	14
2.1.12.2.KLL’ de Tedavi Seçenekleri	16
2.2. Apoptoz	18

2.2.1. Apoptotik Hücre Ölümünün Moleküler Mekanizmaları	18
2.2.1.1 Ekstresek Yol	19
2.2.1.2 İntresek (mitokondriyal) Yol	20
2.2.2. Apoptoz ve Bcl-2 Ailesi	22
2.2.2.1. BCL-2	25
2.2.2.2. MCL-1	26
2.2.2.3. BAX Proteini	27
2.2.3. P53	27
2.2.4. Tedavide Apoptoz Temelli Yaklaşımlar	28
2.3. TCL-1	29
2.4. CD20	29
2.5. CD52	30
<b>3. MATERYAL VE METOD</b>	31
3.1. Olgular	31
3.2. İmmünohistokimyasal İnceleme ve Değerlendirme	32
3.3. İstatistikî Analiz	34
<b>4. BULGULAR</b>	35
<b>5. TARTIŞMA</b>	45
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b>	52
<b>7. KAYNAKLAR</b>	53

### III. ÖZET

## **B HÜCRELİ KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ OLGULARINDA TCL-1, MCL-1, P53, BCL-2, BAX, EKSPRESYONLARININ VE CD20/CD52 ORANININ HASTALIĞIN KLİNİK PARAMETRELERİ VE PROGNOZU İLE OLAN İLİŞKİSİ**

Dr. Nazım GÖZCÜ  
Uzmanlık Tezi, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı  
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Mehmet YILMAZ  
Ağustos 2010, 69 sayfa

Bu çalışmada B Hücreli Kronik Lenfositik Lösemi olgularında TCL-1, MCL-1, P53, BCL-2, BAX ekspresyonlarının ve CD20/CD52 oranının hastalığın klinik parametreleri ve prognozu ile olan ilişkisi değerlendirildi. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Hematoloji Kliniğinde KLL tanısı konulmuş 100 hasta çalışmaya alındı.

RAİ evre 0,I,II olan 79 KLL hastasında 15 yıllık olaysız sağ kalım ile yaş (yaş >65,yaş<65), RAİ evre 0,I,II, RAİ evre 0-I,II, kemik iliği tutulum tipi (nodüler, diffüz), CD38 düzeyi (CD 38 >20, CD 38 <20) ile aralarında anlamlı ilişki bulundu (p değerleri sırasıyla p=0.036, 0.010, 0.003, 0.027, 0.000).

KLL RAİ evre 0,I,II olan 79 KLL hastasında TCL-1 pozitif olan 62 hastanın 15 yıllık olaysız sağ kalımı 124.3 ay, TCL-1 negatif olan 17 hastanın 15 yıllık olaysız sağ kalımı %74 olarak olarak saptandı (p=0.0043).

Sonuç olarak TCL-1 KLL hastalarında prognostik bir belirteç olarak kabul edilebilir. Hastalığın progresyonu ve takibinde yol gösterici olabilir. TCL-1 yolağı inhibisyonu ve BCR inhibisyonu yapan ilaç ve mekanizmalar KLL'de hastalığın klinik gidişini değiştirebilir. Bunun için geniş serili vaka kontrollü çalışmaların yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

**Anahtar Kelimeler:** KLL, TCL-1, MCL-1, BCL-2, BAX, P53, CD20/CD52

#### IV. ABSTRACT

### THE EXPRESSION OF TCL-1, MCL-1, P53, BCL-2, BAX AND CD20/CD52 RATIO RELATION WITH CLINICAL PARAMETERS AND PROGNOSIS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA PATIENTS

Dr. Nazım GÖZCÜ

Residency Thesis, Department of Internal Medicine

Supervisor: Assoc. Prof. Mehmet YILMAZ

August 2010, 69 pages

We investigated expression of TCL-1, MCL-1, P53, BCL-2, BAX and CD20/CD52 ratio in chronic lymphocytic leukemia relation with disease clinical parameters and prognosis in this study. One hundred patients who applied hematology department of Gaziantep University were included in the study.

In 79 of CLL patients who are RAI stage 0,I,II 15 years disease free survival were statistically significant with age (age>65,<65), bone marrow involvement (nodular, diffuse), CD38 expression (CD38>20, cd38<20) (p value p=0.036, 0.010. 0.003, 0.027, 0.000 respectively).

Sixty two of 79 CLL stage 0, I, II patients who TCL-1 were positive 15 yaers disease free survival was 124.3 months and patients who TCL-1 negative disease free survival was 74% (p=0.0043).

In conclusion, TCL-1 can be accepted as prognostic markers. It may be useful in progression of disease and follow up. Inhibition of B cell receptor (BCR) and TCL-1 signal pathway by the drugs may change clinical progression. There study should be supported case control and large clinical trials for this result.

**Key words:** KLL, TCL-1, MCL-1, BCL-2, BAX, P53, CD20/CD52

## V. KISALTMALAR

Apaf-1	: Apoptotic Protease Activating Factor-1
ATM	: Ataksia Telenjektazi Mutasyonu
ATP	: Adenozin Trifosfat
BAX	: Bcl-2 associated X-protein
BCL-2	: B cell CLL/ lenfoma-2
BCR	: B hücre reseptörü
BH	: Bcl-2 homolojisi bölgesi
$\beta$ 2MG	: $\beta$ 2 mikroglobulin
CD	: İnsan lökosit farklılaşma antijenleri
CLB	: Klorambusil
CHOP	: Siklofosfamid, prednisolon, vinkristin, adriamycin
COP	: Siklofosfamid, prednisolon, vinkristin,
CRP	: C reaktif protein
Cyc	: Sitokrom c
DISC	: Ölüm-tetikleyici sinyal kompleksi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DD	: Ölüm bölgesi
ECOG	: Eastern Cooperative Oncology Group
FAD	: Fas-ilişkili ölüm bölgesi
FLD	: Fludarabin
FISH	: Floresan in situ hibridizasyon
Hb	: Hemoglobin
Ig	: İmmunglobulin
IgV	: İmmunglobulin ağır zincir
IgVH	: İmmunglobulin ağır zincir değişken bölge
IWKLL	: Uluslararası KLL Çalışma Grubu
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
LAP	: Lenfadenopati



LDH	: Laktat dehidrogenaz
LDT	: Lenfosit sayısının ikiye katlanma zamanı
MBL	: Monoklonal B lenfositöz
MCL-1	: Miyeloid hücre lösemisi-1
miRNA	: Mikro-ribonükleik asit
M-KLL	: IgVH gen mutasyonu olan KLL
MPT	: Mitokondrial geçiş poru
NCI-WG	: Amerika Milli Kanser Enstitüsü KLL çalışma grubu
NHL	: Non hodgkin lenfoma
PLL	: Prolenfositik Lösemi
RNA	: Ribonükleik asit
ROT	: Reaktif oksijen türevleri
SLL	: Küçük lenfositik lenfoma
TCL-1	: T hücresi lösemi/lenfoma 1
TK	: Timidin Kinaz
TNF- $\alpha$	: Tümör nekrozis faktör alfa
TRAIL	: TNFr-Apoptosis-Inducing Ligand
U-KLL	: KLL IgVH gen mutasyonu olmayan KLL
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
ZAP70	: Zeta zinciri ilişkili protein kinaz 70

## VI. TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> KLL NCI-WG Tanı Kriterleri	6
<b>Tablo 2.</b> KLL IWKLL Tanı Kriterleri	7
<b>Tablo 3.</b> B-hücreli lenfoproliferatif hastalıkların immünofenotipik özellikleri	8
<b>Tablo 4.</b> KLL Rai ve Binet evreleme sistemleri	9
<b>Tablo 5.</b> KLL kromozom bozuklukları ve ilgili özellikler	10
<b>Tablo 6.</b> KLL’de tedavi yanıt kriterleri	15
<b>Tablo 7.</b> KLL Hastalarının Klinik Özellikleri	35
<b>Tablo 8.</b> KLL Hastalarının Laboratuvar Özellikleri	36
<b>Tablo 9.</b> KLL Hastalarının Sitogenetik ve İmmünohistokimyasal Özellikleri	37
<b>Tablo 10.</b> KLL’de TCL-1, BCL-2 ve BAX pozitifliğinin klinik ve laboratuvar parametreleri ile karşılaştırılması (n=100)	38
<b>Tablo 11.</b> Erken evre KLL’de TCL-1, BCL-2 ve BAX pozitifliği ile klinik ve laboratuvar parametrelerinin total sağ kalım ve olaysız sağ kalım üzerine etkisi (Tek değişkenli analiz/ Logrank test)	40
<b>Tablo 12.</b> Erken evre 79 KLL hastasının çok değişkenli analizi (Cox proportional hazard model backward)	42
<b>Tablo 13.</b> First line (F/Alk) tedavi alan KLL hastalarında TCL-1, BCL-2 ve BAX pozitifliği ile klinik ve laboratuvar parametrelerinin olaysız sağ kalım üzerine etkisi (Tek değişkenli analiz/ Logrank test)	43

**VII. ŞEKİL LİSTESİ**

<b>Şekil 1.</b> Apoptoz ekstrinsek yolağının intrinsek yolağı aktivasyonu	20
<b>Şekil 2.</b> Apoptozun intrinsek yolağı	21
<b>Şekil 3.</b> Bcl-2 apoptoz, nekroz, otofaji	22
<b>Şekil 4.</b> Bcl-2 ailesi üyelerinin Şematik gösterimi	23
<b>Şekil 5.</b> TCL-1 pozitif RAİ evre 0,I,II hastalar ile olaysız sağ kalım arasındaki İlişki	39
<b>Şekil 6.</b> RAİ evre 0-I ve RAİ evre II ile olaysız sağ kalım arasındaki İlişki	41
<b>Şekil 7.</b> RAİ evre 0,I,II hastaların kemik iliği tutulum tipi ile olaysız sağ kalım arasındaki İlişki	41
<b>Şekil 8.</b> RAİ evre 0,I,II hastaların CD 38 oranı ile olaysız sağ kalım arasındaki İlişki	42

## VIII. RESİM LİSTESİ

<b>Resim 1.</b> TCL-1 pozitif boyanan kemik iliği örneği	33
<b>Resim 2.</b> TCL-1 negatif boyanan kemik iliği örneği	33
<b>Resim 3.</b> BCL-2 pozitif boyanan kemik iliği örneği	33
<b>Resim 4.</b> BCL-2 negatif boyanan kemik iliği örneği	33
<b>Resim 5.</b> BAX pozitif boyanan kemik iliği örneği	33
<b>Resim 6.</b> BAX negatif boyanan kemik iliği örneği	33

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik lenfositik lösemi, olgun görünümlü, çok az sitoplazması olan, yuvarlak veya oval nükleuslu, küçük, proliferasyon hızı düşük olan çoğalmayan lenfositlerin, kan, kemik iliği, lenf nodu ve dalakta birikmesi ile ortaya çıkan klinik tablodur. Kronik KLL hücreleri monoklonal B lenfositlerdir, CD5 ve CD23 (+) olmaları sadece kendilerine has özelliklerdir (1). KLL tanısı için, periferik kanda  $5 \times 10^3/\text{ml}$ , tipik immünofenotip özellikler gösteren lenfosit popülasyonunun varlığı gerekmektedir. Genellikle medyan lenfosit sayısı  $30 \times 10^3/\text{ml}$ ' dir ve bu sayı zamanla giderek artmaktadır. Periferik yaymada sıklıkla parçalanmış lenfositler (basket cells, smudge cells, smear cells) gözlenir (1). Lösemik hücreler CD5(+)'tir. Diğer B hücre belirteçlerinden CD19, CD20(zayıf), CD43 ve CD79b(zayıf) eksprese ederler. Hücreler genelde klonal hafif zincir kısıtlamalıdır, sIgM ve sIgD'yi zayıf eksprese eder, CD23(+), CD22(+/-), CD10(-) ve FMC7(-) tir (1).

Prognozun belirlenmesinde Rai ve Binet klinik evreleme sistemleri ile birlikte Kronik lenfositik lösemi' de hastalığın seyri ve prognozu hakkında önemli veriler sağlayan birçok klinik, sitogenetik ve immunolojik değişken mevcuttur (1).

Kronik lenfositik lösemi' de fonksiyonel olgunlaşmaları tam olmayan antijenik uyarılara; genellikle göreceli cevapsız olan bu lenfositlerde programlanmış hücre ölümünü engelleyici onkojen mutasyon ve delesyonlarının neden olduğu apoptoz defektleri mevcuttur. Kronik lenfositik lösemi patofizyolojisinde artmış proliferasyondan çok defektif apoptozun varlığı ve öneminden bahsedilmektedir. KLL gelişiminde apoptoz direnci ve BCL-2 protein ailesi önem taşımaktadır. BCL- 2 protein ailesinin denetim işlevinde bozukluk mevcuttur. CD 20 ve CD52 antijenleri KLL de kullanılan önemli prognostik belirteçlerden diğerleridir. KLL tedavisinde kullanılan monoklonal antikorlar olan rituximab alemtuzumab için önemli tedavi hedefleridir.

Bu çalışmada kliniğimizde takip ve tedavi edilen B hücreli kronik lenfositik lösemi olgularında TCL-1, MCL-1, BCL-2, BAX, P53 ve CD20/CD52 oranlarının hastalığın klinik parametreleri ve prognozu ile olan ilişkisi araştırılacaktır.

## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Kronik Lenfositik Lösemi**

#### **2.1.1.Tanım**

Kronik lenfositik lösemi (KLL), olgun görünümlü, çok az sitoplazması olan, yuvarlak veya oval nükleuslu, küçük, proliferasyon hızı düşük olan çoğalmayan lenfositlerin, kan, kemik iliği, lenf nodu ve dalakta birikmesi ile ortaya çıkan klinik tablodur. KLL hücreleri monoklonal B lenfositlerdir, CD5 ve CD23 (+) olmaları sadece kendilerine has özelliklerdir (1).

#### **2.1.2. Epidemiyoloji ve Etiyoloji**

Batı ülkelerinde en sık görülen lösemi tipidir ve tüm lösemilerin %20-30'unu, 65 yaşının üstündeki kişilerdeki lösemilerin %40'ını oluşturur. 70 yaş üzerinde insidansının 50/100.000'e kadar yükseldiği belirtilmektedir. Erkek/Kadın oranı 2/1'dir. Genç yaşlarda görülme sıklığı artmaktadır ve olguların %7-24'ünün 55 yaşın altında olduğu bildirilmektedir (2).

Etiyolojik çalışmalarda; kimyasal etkenler, radyasyon, diyet, virüs enfeksiyonu ve otoimmün hastalıkların risk faktörü olduğu bugüne kadar kesin olarak gösterilememiştir Birinci ve ikinci derecedeki akrabalarında hastalığın gelişme riski yüksek olup ailesel KLL hastaları, sporadik KLL hastalarına göre ortalama 10 yaş daha gençtir (2).

#### **2.1.3. Patogenez**

##### **2.1.3.1. B Lenfosit Yapısı ve Olgunlaşma Süreci**

Konak savunma mekanizması, doğal bağışıklık ve kazanılmış bağışıklık aşamalarından oluşmaktadır. Kazanılmış bağışıklığın en önemli özellikleri antijenik özgüllük ve bellek oluşumudur. B lenfositler, esas olarak humoral bağışıklığı ya da antikorlar aracılığıyla oluşan kazanılmış immün yanıtı düzenleyen hücrelerdir (3). B hücre reseptörü (BCR) birbirine disülfid bağlarla bağlanmış iki ağır ve iki hafif zincir içeren heterodimer bir yapıdır. Her polipeptid zinciri bir değişken ve bir sabit bölgeden oluşur. Değişken bölge antijen tanımakla görevli iken, sabit bölge immunglobulin (Ig) izotipini belirler ve efektör işlevlerden sorumludur.

B hücre olgunlaşması erken (antijen bağımsız) ve geç (antijen bağımlı) evrelerden oluşur. Pre B hücresinde Ig ağır zincir düzenlenmesinin ardından hafif zincir oluşumu gerçekleşir. Böylelikle yüzeyinde tam bir Ig molekülü ifadelenen olgun B hücresi oluşur ve erken-antijen bağımsız evre tamamlanmış olur. Olgun ancak antijenle karşılaşmamış naif B hücresi kemik iliğinden ayrılarak periferik lenfoid dokulara gider. Geç ya da antijen bağımlı evrede, antijenle karşılaşan B hücreleri lenf nodlarının germinal merkezlerinde toplanıp antikor sentezleyebilen B hücreleri veya bellek hücrelerine dönüşürler (3).

### **2.1.3.2. KLL de B Hücre Morfolojisi ve KLL Biyolojisi**

KLL hücresi antijenle karşılaşarak aktive olmuş olgun B hücresinden gelişmektedir. Hücre yüzeyindeki Ig düzeyinin soluk oluşu ve CD5 pozitifliği bu hücrelerin kaynağı hakkındada ipuçları vermektedir. Mantle zonun sınırında yerleşik germinal merkezlerde bulunan normal CD5(+) B lenfositler polireaktif, düşük afiniteli doğal antikorlar salgırlar. Bu antikorlarda B-KLL'de olduğu gibi aynı immünglobulin ağır zincir (IgV) gen bölgesi tarafından kodlanmaktadır. Bu benzerliklerden yola çıkarak KLL B lenfositlerinin mantle zon yerleşimli, doğal polireaktif otoantikorlar sentezleyen anerjik CD5 (+) hücreler oldukları düşünülmüştür (4).

KLL patofizyolojisinde artmış proliferasyondan çok defektif apoptozun varlığı ve öneminden bahsedilmektedir. Non-radyoaktif izotopik işaretleme yöntemi kullanılarak B-KLL hücrelerinin kinetiğinin in vivo olarak ölçüldüğü bir çalışmada, lösemik hücrelerin çoğalma hızının %0.1-1/gün olduğu gösterilmiş, hücre çoğalma hızının >%0.35/gün olmasının agresif klinik seyirle ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. KLL'nin uzun yaşam süresine sahip lenfositlerin birikimi sonucu oluşan statik bir hastalık olmadığı, aksine aktif hücre yaşam döngüsünün işlev gördüğü dinamik bir süreç olduğu öne sürülmüştür (5).

KLL gelişiminde apoptoz direnci ve B cell CLL/ lenfoma-2 (BCL-2) protein ailesi önem taşımaktadır. BCL- 2 protein ailesinin denetim işlevinde bozukluk mevcuttur. Normal CD5 (+) hücreler ile B-KLL hücreleri arasında miRNA (Mikro-ribonükleik asit) ifadenmesi açısından farklılıklar gösterilmiştir. Gen ifadenmesinin düzenlenmesinde önemli role sahip miRNA15a ve miRNA16-1, BCL-2'yi inhibe etmektedir ve lösemik hücre dizisinde apoptozu indüklemektedir (6).

Apoptozun kontrolünde birçok protein önemli rol oynar. İleriye dönük yapılan araştırmalarda, zamanla p53 mutasyonu taşıyan hücrelerin sayısının giderek arttığı ve tümör hücrelerinin sağ kalımının daha da uzadığı gösterilmiştir (7). Murine double minute-2 (mdm-2) geni p53 tarafından etkin hale getirilir.

Bu genin fazla eksprese olması durumunda, p53'ün hücreyi G1 evresinde durdurabilme özelliği azalır, apoptozun etkin hale gelmesi yavaşlar ve tedaviye direnç gelişir (8). Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ilişkili otokrin yolağın antiapoptotik proteinleri indükleyerek hücre yaşam süresini uzattığı düşünülmektedir (9).

KLL patofizyolojisinde BCR sinyal ağı ve antijenik uyarım önemli rol oynamaktadır. BCR yapısında sIg, Ig $\alpha$  /Ig $\beta$  (CD79a/CD79b) heterodimerleri bulunur. KLL'de lösemik B-lenfositlerinin %99'undan fazlasının hücre siklusunun G0 fazında olma sebebi olarak BCR kompleksindeki değişiklikler ve bu değişikliklerin hücre proliferasyonu için gerekli sinyallerin yetersiz algılanmasına yol açması düşünülmektedir. Bu düşük BCR ifadenmesi KLL lenfositlerinin tipik özelliğidir (10).

BCR sinyal yolunun diğer önemli molekülü neoplastik klonun çoğalmasından sorumlu olan CD38'dir. CD38, B hücre gelişiminin farklı aşamalarında önem taşımakta, B- KLL hücrelerinin gelişimini kolaylaştırmakta ve hücre yaşam süresini uzatmaktadır (9).

KLL hastalarının immunglobulin ağır zincir (IgVH) genleri değerlendirildiğinde; germinal merkezi geçebilen hücrelerden kaynaklanan mutant IgVH genotipiyle (M-KLL), naif B lenfositlerden köken alan mutant olmayan (U-KLL) IgVH fenotipine sahip olan iki KLL alt tipi bulunmaktadır. Olguların yaklaşık yarısında IgVH somatik mutasyonları mevcuttur. M-KLL hücreleri anerjik iken, U-KLL hücreleri yeterli BCR sinyal kapasitesine sahiptir ve bu hücreler antijenik uyarıya daha iyi yanıt vermektedir (10).

Zeta zinciri ilişkili protein kinaz 70 (ZAP70), reseptör bağımlı bir tirozin kinaz proteindir. T ve NK hücrelerinde bulunurken, dolaşımdaki normal B hücrelerinde bulunmaz. ZAP70 (+) KLL hücrelerinde BCR'nin uyarılması sonucunda artmış tirozin kinaz fosforilasyonu ve hücre içi kalsiyum serbestleşmesi gerçekleşmektedir. Dolayısıyla ZAP70, KLL hücrelerinde BCR sinyal yolağını aktifleştirerek yaşam süresini uzatmakta ve hastalık seyrini hızlandırmaktadır (11).

İn vitro ortamda, KLL hücreleri tarafından üretilen TNF- $\alpha$  (tümör nekrozis faktör alfa), BCL-2'yi etkin hale getirerek apoptozu azaltıp normal lenfositlerin çoğalmasını baskılar ve KLL hücrelerinin yayılmasını kolaylaştırır. KLL hastalarının çoğunda ve özellikle de ileri evre vakalarda TNF- $\alpha$  serum düzeyleri yüksek bulunmuştur (12).

CD40, tümör nekrozis faktör (TNF) ailesinden olan ve B hücre yüzeyinde eksprese edilen bir glikoproteindir. CD40, B hücrelerin olgunlaşmasında ve fonksiyonunda önemli rol oynar. Bu proteinin ligandı (CD40L) T hücrelerin üzerinde bulunur.



CD40'ın uyarılması ile KLL hücrelerinin çoğalması hızlanır ve sitokin salınımı artar. Ayrıca kemoterapinin indüklediği apoptoza karşı direnç gelişir (13).

#### **2.1.4. Laboratuvar Bulguları**

KLL tanısı için, periferik kanda  $5 \times 10^3/\text{ml}$ , tipik immünofenotip özellikler gösteren lenfosit popülasyonunun varlığı gerekmektedir. Genellikle medyan lenfosit sayısı  $30 \times 10^3/\text{ml}$ 'dir ve bu sayı zamanla giderek artmaktadır. Periferik yaymada sıklıkla parçalanmış lenfositler (basket cells, smudge cells, smear cells) gözlenir (1).

KLL'de kemik iliği tutulumu diffüz, interstisiyel, nodüler veya karışık (nodüler ve interstisiyel) olabilir (1). Klasik B hücreli KLL'de lösemik hücreler CD5(+) tir. Diğer B hücre belirteçlerinden CD19, CD20(zayıf), CD43 ve CD79b(zayıf) eksprese ederler. Hücreler genelde klonal hafif zincir kısıtlamalıdır, sIgM ve sIgD'yi zayıf eksprese eder, CD23(+), CD22(+/-), CD10(-) ve FMC7(-) tir (1).

CD5 antijeni en sık olgun T lenfositleri ile bağlantılıdır ve normal T lenfositlerinde hücre aktivasyonunda rol oynar. Ayrıca timositlerde de zayıf olarak eksprese edilir. Bunun dışında lenf nodlarının mantle bölgesinde bulunan normal B lenfositleride CD5 taşıyabilir ve bazen de periferik kandada bu hücrelere rastlanabilir (14).

KLL'de pozitif olan CD23; aktivasyon belirteci olup, apoptozun baskılanmasında rol oynar. KLL'nin, diğer CD5(+) olan hastalıklardan (Mantle hücreli lenfoma) ayırımı için önemlidir. Yaklaşık %16 hastada FMC7 (+) bulunabilir. Sıklıkla FMC7 (+) olan hastalarda yüzey IgM ekspresyonu belirgin olup, CD23 (-) tir ve bu hastalarda prognoz oldukça kötüdür (15).

#### **2.1.5. Klinik Bulgular**

Hastaların yarısı asemptomatiktir ve başka nedenlerle yapılan kan tetkiklerinde tesadüfen lenfositozun saptanması sonucunda hekime başvurur. Daha az sıklıkla lenfadenopati (LAP) veya splenomegalinin araştırılması sonucunda tanı alabilir. Diğer lenfomalardan farklı olarak, ateş, gece terlemesi ve kilo kaybı özellikle erken evre hastalarda nadiren görülür (1).

Lenfadenopati ile gelen hastalarda sıklıkla splenomegalide eşlik eder. Servikal LAP, aksiller ve inguinal LAP'a göre daha sık görülür. Erken evre hastalarda dalak büyümesi sınırlıdır.

Masif splenomegali, prolenfositik lösemi (PLL) esnasında veya atipik KLL formlarında görülebilir. Nadiren, tonsiller infiltrasyon, cilt tutulumu veya retroperitoneal konglomere LAP şeklinde bulgu verebilir. Hastaların bir kısmında, trombositopeni, kazanılmış von Willebrand faktör eksikliği veya faktör VIII eksikliğine bağlı gelişen kanamalar gözlenebilir.

### 2.1.6. Tanı

KLL tanısında en kabul gören Amerika Milli Kanser Enstitüsü KLL çalışma grubunun (NCI-WG) tanı kriterleridir (Tablo 1) (16). 2005 yılında Uluslararası KLL Çalışma Grubu (IWKLL) bu kriterleri yeniden düzenlemiştir (Tablo 2) (17).

**Tablo 1.** KLL NCI-WG Tanı Kriterleri

<b>KLL de tanısal ölçütler</b>	<b>NCI-WG</b>
<b>Lenfosit sayısı(x10<sup>9</sup>)</b>	>5
<b>Morfoloji</b>	Ölçüt yok
<b>İmmünofenotipi</b>	≥1 B hücre belirteci (CD19, CD20, CD22) ve CD5 pozitifliği ile birlikte T-hücre belirteçlerinin yokluğu  Kappa ve Y zincirlerinin monoklonal varlığı  Düşük dansiteli yüzeysel Ig
<b>Atipik hücreler(Örn:Prolenfosit)</b>	<%55 ve/veya <%15x10 <sup>9</sup> /L
<b>Lenfositöz süresi</b>	Ölçüt yok
<b>Kemik iliği lenfosit oranı (%)</b>	≥%30

**Tablo 2.** KLL IWKLL Tanı Kriterleri

<b>KLL de tanısal ölçütler</b>	<b>IWKLL</b>
<b>Lenfosit sayısı(x10<sup>9</sup>)</b>	Ölçüt yok
<b>Morfoloji</b>	Nukleolussuz küçük olgun lenfositler ve parçalanmış lenfositlerin varlığı
<b>İmmünfenotipi</b>	≥1 B hücre belirteçleri (CD19, CD20, CD 22) ve CD5 pozitifliği ile birlikte T-hücre belirteçlerinin yokluğu  Kappa ve Y zincirlerinin monoklonal varlığı  Düşük dansiteli yüzeysel Ig
<b>Atipik hücreler (Örn: Prolenfosit)</b>	<%55 ve/veya <%15x10 <sup>9</sup> /L
<b>Lenfositöz süresi</b>	Ölçüt yok fakat kronik olmalı
<b>Kemik iliği lenfosit oranı (%)</b>	Kemik iliği değerlendirmesi gereksiz*
* Sadece sitopenilerin etyolojisi için gerekli	

Çevre kanında  $<5 \times 10^3/\text{ml}$  oranında lenfosit bulunması, ancak eşlik eden LAP, organomegali veya kemik iliği tutulumuna bağlı sitopeni varlığında klinik tanı küçük lenfositik lenfoma/KLL'dir. Eşlik eden klinik bulguların olmaması durumunda tanı monoklonal B lenfositozdur (MBL) ve MBL KLL'ye dönüşebilir, gerileyebilir ya da kararlı kalabilir.

### 2.1.7. Ayırıcı Tanı

Lenfositöz ile seyreden ve klinik prezentasyonu nedeniyle KLL ile ayırt edilmeyi gerektiren pek çok hastalık bulunur. Bunlar bakteriyel (tüberküloz vb.), viral (enfeksiyöz mononükleozis vb.), ısrarcı poliklonal B hücreli lenfositöz, hiperaktif malarial splenomegali gibi benign nedenler ayrıca B ve T hücre malign hastalıklarıdır. B-hücreli lenfoproliferatif hastalıkların immünfenotipik özellikleri Tablo 3'de verilmiştir (18).

**Tablo 3 .B-hücreli lenfoproliferatif hastalıkların immünotipik özellikleri**

<b>Belirteç</b>	<b>KLL</b>	<b>HCL</b>	<b>Foliküler Lenfoma</b>	<b>Mantle Hc. Lenfoma</b>	<b>Marginal zon Lenfomaları</b>	<b>Villöz lenfositli Splenic lenfoma</b>
<b>sIg</b>	Az	+++	++	++	++	++
<b>CD5</b>	++	-	-	++	-	-/+
<b>CD10</b>	-	-	++	-	-	-/+
<b>CD11C</b>	-/+	++	-	-	+/-	+/-
<b>CD19</b>	++	+++	++	++	++	++
<b>CD20</b>	Az	+++	++	++	++	++
<b>CD22</b>	-/+	+++	++	++	+/-	++
<b>CD23</b>	++	-	-	-	+/-	+/-
<b>CD25</b>	-/+	+++	-	-	-	+/-
<b>CD79b</b>	-	++	++	++	++	++
<b>CD103</b>	-	+++	-	-	-	+/-
<b>FMC7</b>	-/+	++	++	+	+	++

### 2.1.8. Evreleme

Bugün için KLL de kullanılan güncel iki farklı evreleme sistemi mevcuttur. Tablo 4’de Rai ve Binet evreleme sistemleri olarak adlandırılan bu evreler verilmektedir.

**Tablo 4.** KLL Rai ve Binet evreleme sistemleri

<b>Rai</b>		
Evre 0	Çevre kanı ve kemik iliğinde lenfositöz	12 yıl
Evre I	Lenfositöz + lenfadenopati	
Evre II	Lenfositöz + splenomegali veya hepatomegali	7 yıl
Evre III	Lenfositöz + anemi [hemogloblin (Hb)<11 gr/dl]	
Evre IV	Lenfositöz + trombositopeni (<100x10 <sup>9</sup> /L)	<3 yıl
<b>Binet</b>		
Evre A	<3 bölge tutulumu (+), Hb>10 gr/dl,  platelet>100x10 <sup>9</sup> /L	9 yıl
Evre B	>3 bölge tutulumu (+), Hb>10 gr/dl,  platelet>100x10 <sup>9</sup> /L	5 yıl
Evre C	Hb<10 gr/dl veya platelet<100x10 <sup>9</sup> /L  Tutulum bölgeleri: Karaciğer, dalak, inguinal/aksiller/servikal lenf nodları	2 yıl

Her iki sistemdede evre ile sağ kalım süresi arasında anlamlı bir ilişki mevcuttur. Herhangi bir evrede bulunan hastalar arasından hastalığı progresif olabilecek hastaların yavaş seyredecek olgulardan ayrımında yararlı olmamaları, sitopeniler üzerinde durulmaması evreleme sistemlerinin eksiklikleri olarak belirlenmiştir.

### 2.1.9. Sitogenetik İnceleme:

KLL de son zamanlarda sitogenetik değişiklikler prognoz belirleyici olarak önem kazanmıştır. Konvansiyonel kromozom analizi ile olguların %40–50 kadarında buna karşılık floresan in situ hibridizasyon (FISH) ile olguların %80’inde genomik bozukluklar tespit edilmektedir (19).

KLL’de en sık rastlanan yapısal anomali 13q14 delesyonudur. Bu vakalar genelde IgV bölgesinde mutasyonlar taşır, normal morfolojiye sahiptir ve iyi prognozludurlar (19). KLL hastalarının yaklaşık %20’sinde 11q22-q23 delesyonu gözlenmektedir. Genelde genç hastalarda görülür, yaygın LAP ile ilişkilidir, hastalık hızla ilerler ve sağ kalım kısadır (20). Trizomi 12q13, KLL hastalarının %10-20’inde görülür ve sıklıkla atipik morfoloji gösteren KLL formları ile ilişkilendirilmiştir. KLL de görülen kromozom bozuklukları, sıklığı, ilgili genleri ve klinik özellikleri Tablo 5’te verilmiştir (19).

**Tablo 5.** KLL kromozom bozuklukları ve ilgili özellikler

<b>Kromozom anomalisi</b>	<b>Sıklık</b>	<b>İlgili genler</b>	<b>Klinik özellikler</b>
<b>Del 13q14.3</b>	%36-%50	RB1’e telomerik	Düşük CD38 IgVH mutasyonları + İyi prognoz
<b>Del 11 q22-q23</b>	%17-%19	ATM geni	Belirgin LAP Kısa sağkalım (Özellikle <55y)
<b>Trizomi 12</b>	%15-%20	MDM2 geni	Yüksek CD38 oranı IgVH mutasyonları (-) Agresif hastalık, atipik morfoloji
<b>Del 17p13.3</b>	%7-%15	p53	KLL/PL Richter dönüşümü Kısa sağkalım Purin analoglarına yanıtızsızlık
<b>Del 6 q</b>	%6-%10		Yüksek lenfosit sayısı Belirgin LAP

### 2.1.10. Komplikasyonlar:

KLL'de otoimmün sitopeniler ve diğer otoimmün patolojilerin sıklığında artış bilinmektedir. En sık karşılaşılan immün sitopeni otoimmün hemolitik anemidir. Olguların %20-30'unda direkt coombs testi pozitif bulunmasına karşılık immün sitopeni olasılığı muhtemelen daha düşüktür. Kortikosteroid tedavisi ile olguların %70'inde yanıt alındığı ve otoimmün hemolitik aneminin yaşam süresine olumsuz etkisi olmadığı gösterilmiştir (21).

Daha seyrek olarak otoimmün trombositopeni, saf eritroid dizi aplazisi, nefrotik sendrom ve paraneoplastik pemfigus bildirilmektedir. Normal toplumda görülenden daha fazla sıklıkla diğer kanser tipleri ortaya çıktığı bilinmektedir. KLL olgularında diğer lenfoproliferatif hastalıklara dönüşümlerde bildirilmektedir. Richter sendromu büyük hücreli lenfomaya transformasyondur (%5-15) ve oldukça kötü seyirli, tedaviye dirençlidir. Bir diğer dönüşüm de prolenfositik lösemi şeklindedir (22).

KLL'de en sık morbidite ve mortalite nedeni ise infeksiyonlardır ve hastalığa ait nedenler yanında bazı tedavi türleride buna zemin hazırlar.

### 2.1.11. Prognostik Faktörler

**Klinik Evre:** Hastalık evresi en önemli prognostik belirteç olarak yerini korumaktadır. Düşük risk (Rai 0, Binet A) hastalarda ortalama sağkalım 15 yıl, orta riskli hastalarda (Rai I/II, Binet B) 5-7 yıl, yüksek riskli (Rai III/IV, Binet C) hastalarda 3-4 yıldan azdır. Binet A evresi ve Rai düşük risk grubunda olan hastaların ortalama yaşam süreleri 10 yıl olmasına rağmen, bu hastalardan %40'ı ileri evrelere geçecektir ve %50'si herhangi bir zamanda tedavi almak zorunda kalacaklardır. Hastaların %25'i de KLL nedeniyle yaşamlarını kaybedeceklerdir (23).

**Yaş ve Cinsiyet:** Hastaların yaklaşık %10'u 50 yaşından gençtir ve bu hastalar ileri yaş grubundaki hastalar benzer klinik özellikler gösterir. Her iki yaş grubunda da sağkalım benzer, ancak KLL'ye bağlı ölüm riski genç yaş grubunda daha fazladır. Genç yaş grubunda olan hastaların bir kısmında oldukça kötü seyretmektedir ve bu kişilerde Richter transformasyonu riski beş kat daha fazladır. Yaş ve evreye bakmaksızın, kadınlarda prognoz genellikle daha iyi olduğu bildirilmiştir (24,25).

**Lenfosit özellikleri:** Hastaların yaklaşık %20'i atipik KLL veya KLL/PLL özellikleri taşır. Bu hastalar genelde ileri evrededir, yüksek proliferatif indeksleri vardır ve prognozları kötüdür. Bunun dışında, atipik morfolojik özellikler taşıyan hastalarda; trizomi 12, del 17p, CD38 (+) ve IgV mutasyon eksikliğine daha sık rastlanmaktadır (26).

Lenfosit sayısının artması ile sağ kalım azalmaktadır. Lenfosit sayısı  $20 \times 10^3/\text{ml}$ 'den az ise ortalama sağ kalım 8,6 yıl iken, lenfosit sayısı  $40 \times 10^3/\text{ml}$ ' den fazla olduğunda beklenen sağ kalım süresi 3,7 yıldır (27).

Lenfosit sayısının ikiye katlanma süresi (LDT) hastalığın agresif seyrini takip etmek için yararlı bir ölçüttür. İndolent KLL hastalarında ikiye katlanma süresi oldukça uzundur, ancak bu sürenin 12 aydan kısa olduğu vakalarda belirgin olarak sağ kalım kısalmaktadır (28).

**Kemik iliği tutulum şekli:** Nodüler yayılım olan hastaların sağ kalımı 90, interstisyel yayılım olan hastaların sağ kalımı 46, diffüz yayılım özellikleri taşıyan hastaların ortalama sağ kalımları 28 aydır. Kemik iliğinde fibrozisin saptanması, hızlı hastalık seyri ile ilişkili iken (29), kemoterapi sonrası kemik iliğinde hala lenfoid nodüllerin bulunması (nodüler parsiyel remisyon) kısa sürede relaps gelişeceğinin işaretidir (30). Kemik iliği tutulum şeklinin evreye ek olarak farklı bir prognoz değeri taşımadığını ileri süren çalışmalarda mevcuttur (31).

**IgVH mutasyon durumu:** U-KLL ve M-KLL olguları; klinik seyir, tedavi gereksinimi, sitogenetik anormallikler ve sağkalım açısından farklılık göstermektedir. M-KLL'de ortalama sağkalım 10–25 yıl iken, U-KLL'de 5–10 yıldır. U-KLL; ileri evre, ilerleyici klinik seyir, atipik morfoloji, kötü sitogenetik anormallikler ve tedavi direnci ile birliktedir (32).

IgVH gen mutasyon durumunun sabit olması ve hastalığın her döneminde aynı kalması, prognozun erken dönemde tayini için büyük önem taşımaktadır. Tespitindeki güçlük nedeniyle IgVH gen mutasyon durumunu yansıtabilecek biyolojik belirteçler üzerinde durulmaktadır. IgVH gen mutasyon durumu ile ilişkisi gösterilmiş belirteçler ZAP70, CD38, timidin kinaz (TK), sitidin deaminaz, lipoprotein lipaz A ve ADAM 29'dur (33).

**CD-38 ekspresyonu:** CD38, bağımsız prognostik belirteçlerden biridir. U-KLL olgularında ifadenmesi artarken, M-KLL olgularında azalmıştır. CD38'in ZAP70, sitogenetik özellikler,  $\beta 2\text{MG}$  ve sCD23 gibi diğer prognostik belirteçlerle de ilişkisi gösterilmiştir (34).

**ZAP-70:** ZAP70 ifadenmesinin IgVH gen mutasyon durumu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. ZAP70 U-KLL olgularında pozitif, M-KLL olgularında negatiftir. Sabit kalan ifadenme oranı, ZAP70'in IgVH mutasyon durumunu yansıtabileceğini duyarlılığını arttırmıştır (33). ZAP70, KLL'de bağımsız prognostik belirteç olarak kabul edilmektedir ve ilk tedaviye kadar geçen süreyi etkileyen en önemli belirteç olduğu vurgulanmaktadır (33).



Orchard grubunun yaptığı çalışmada ZAP 70 (-) hastalarının median yaşama süresi 24,5 sene iken ZAP 70 (+) hastaların median yaşama süresi ise 9,3 sene olarak gösterilmiştir (35).

**P53 inaktivasyonu:** KLL hastalarının %15 inde görülmekle birlikte tanıdan tedaviye kadar geçen sürede azalma, agresif hastalık ve kısa yaşam süresiyle birlikte.

**Kromozom anomalileri:** Hastalık seyri esnasında, yeni klonal anomalilerin gelişme insidansı %16 ile %39 arasında bildirilmektedir. 11q ve 6q'de delesyonların sonradan gelişmesi, hastalığın hızla ilerlemesine neden olmaktadır (36,37).

Tek başına 13q14 delesyonlu olguların sağkalımları daha uzun bulunmuştur. 11q22.23 ve 17p13 delesyonları kötü prognozu gösterir ve sağkalımı olumsuz etkiler. Sitogenetik faktörlerin prognoz üzerine etkisi, IgVH gen mutasyon durumu ve klinik evreden bağımsızdır (32). 17p13 ve 11q22.23 delesyonları U-KLL'de, 13q14 delesyonu ise M-KLL'de daha sıktır (38).

#### **Serum belirteçleri:**

$\beta$ 2Mikroglobulin; çekirdekli hücrelerde ifadelenen membran bağımlı bir proteindir. Tümör yükü ve hastalık evresi ile ilişkilidir (39). Aktivitesindeki artış hastalığın hızlı ilerlemesi ve kısalmış yaşam süresini göstermektedir

Timidin Kinaz; DNA sentezinin kurtarma yolunda görev yapan hücrel bir enzimdir. Tümör yükü ile doğru orantılıdır. Yüksek TK düzeyi; U-KLL, CD38 ve ZAP70 ifadelenmesi, 11q delesyonu, 17p delesyonu ve trizomi 12 ile ilişkilidir (39).

Çözünür CD23; tümör çoğalmasını gösterir. Yüksek düzeyde ifadelenmesi, dinlenme fazındaki KLL hücrelerinin G1 ve S fazına geçişini gösterir. Diffüz kemik iliği tutulumu ve kısa LKZ gibi kötü prognostik belirteçlerle ilişkisi gösterilmiştir (39).

Laktat dehidrogenaz (LDH); hücre döngüsünü gösteren bir belirteçtir. Yüksek LDH düzeyleri sağkalımı olumsuz yönde etkilemektedir (40).

Telomeraz aktivitesi; KLL'de hücre bölünmesi telomeraz aktivitesini arttırmakta ve telomer uzunluğunu kısaltmaktadır. Yüksek telomeraz aktivitesi ve telomer kısalığı olumsuz prognostik faktörlerdir (40).

Fibroblast büyüme faktörü (FGF), VEGF, anjiogenin ve anjiopoetin-2 KLL patogenezi ve prognozunda etkisi araştırılan diğer belirteçlerdir. İleri evre ve ilerleyici hastalık ile ilişkili oldukları gösterilmiştir (40).

## 2.1.12.Tedavi

### 2.1.12.1. Tedavi Endikasyonları ve Tedavi Yanıt Değerlendirmesi

Çalışmalar erken evrede uygulanan tedavilerin yaşam süresi üzerinde olumlu bir etki yaptığını kanıtlayabilmiş değildir. Bu nedenle genellikle erken evrelerde tedavi için acele edilmez. Buna karşılık bazı hastalar tanıdan sonraki 1–2 yıl içinde kaybedilirler. Bu nedenle hangi hastanın ne zaman tedavi edileceği çok önemli bir sorundur.

NCI-WG tarafından tanımlanan tedavi endikasyonları (1) bu güne dek uygulanmakla birlikte ortaya atılan yeni prognoz parametreleri doğrultusunda değiştirilmeleri muhtemeldir.

#### NCIWG

- Aşağıdaki hastalık semptomlarından en az birisinin varlığı
  - >%10 kilo kaybı (6 ayda)
  - Günlük, aktiviteyi engelleyecek halsizlik (ECOG 2 veya daha kötü)
  - İki hafta veya daha fazla süren, infeksiyonla ilişkisi gösterilmeyen ateş
  - İnfeksiyonla ilişkisiz gece terlemesi
- Anemi/trombositopeni oluşması veya derinleşmesi şeklinde ilerleyici kemik iliği yetersizliği bulguları
- Kortikosteroid tedaviye yanıtı olmayan otoimmün hemolitik anemi ve/veya trombositopeni
- Kosta kenarını >6 cm geçen, massif veya ilerleyici splenomegali
- En uzun çapı >11cm olan massif veya gruplar oluşturan veya ilerleyici LAP
- İki ay içinde %50 artan ilerleyici lenfositoz veya tahmini LDT <6ay
- Yukardaki kriterler mevcut değilse belirgin hipogamaglobulinemi veya monoklonal protein oluşumu protokol tedavileri için yeterli değildir.

KLL de NCIWG ve IWKLL grubu tarafından tanımlanan tedavi yanıt kriterleri Tablo 6'da verilmektedir (1).

**Tablo 6.** KLL’de tedavi yanıt kriterleri

	<b>Parametre</b>	<b>NCIWG</b>	<b>IWKLL</b>
<b>Tam yanıt</b>	Fizik Muayene	Normal	Normal
	Semptom	Yok	Yok
	Lenfositler ( $\times 10^9/L$ )	$\leq 4$	$\leq 4$
	Nötrofiller ( $\times 10^9/L$ )	$\geq 1.5$	$\geq 1.5$
	Trombosit $\times 10^9/L$ )	$>100$	$>100$
	Hb (g/dl)	$>11$	?
	Kemik iliği lenfosit % tutulum	$<30$ , nodül -	Normal (nodül veya fokal tutulum olabilir.)
<b>Nodüler kısmi remisyon</b>		Kemik iliğinde nodül veya fokal tutulum var Diğer veriler tam yanıt kriterlerine uygun	Tanımlanmamış
<b>Kısmi remisyon</b>	Fizik muayene	$\geq \%50$ azalma	Evrede azalma
	Nötrofil ( $\times 10^9/L$ )*	$\geq 1.5$	
	Hb (g/dl) *	$\geq$ veya $\%50$ artış	
	Trombosit $\times 10^9/L$ )*	$>100$	
	Yanıt süresi	$\geq 2$ ay	?
<b>İlerleyici Hastalık</b>	Fizik muayene (kc, dalak, LAP)	$\geq \%50$ artış veya yenilerinin oluşması	Evrede İlerleme
	Lenfosit sayısı	$\geq \%50$ artış veya Richter sendromu	
<b>Dengeli hastalık</b>	Diğer tümü		Evrede değişme yok
*En az bir tanesi gereklidir.			

### 2.1.12.2.KLL Tedavisinde Seçenekler

#### **Kortikosteroidler:**

Kortikosteroidler tek başlarına veya alkilleyicilere ek olarak kombine tedavilerde kullanılmışlarsa da hastalık sonucuna olumlu katkı yaptıklarına dair bir kanıt yoktur. Genellikle olguların %30–50'sinde iyi kriterize edilmemiş yanıtlar sağladıkları bildirilmiştir (41). Daha çok immün sitopenilerin tedavisinde kullanılırlar.

#### **Alkilleyici ajanlar:**

En sık kullanılan ajan klorambusil (CLB)'dir ve bunu siklofosfamid izlemektedir. Ayrıca kombine kemoterapi protokollerinde yer alır. Prednisolon ilave etmenin yararı kanıtlanabilmiş değildir (41). Aralıklı yüksek doz CLB uygulanmasının fludarabin (FLD) ile karşılaştırmasında tam yanıt oranı, toplam yanıt ve yanıt süresi FLD ile daha iyi bulunurken toplam sağ kalım süreleri arasında bir fark bulunmadığı görülmüştür. Yapılan birçok çalışmanın özetinde düşük doz CLB ile tam yanıt veya kür şansı oldukça düşüktür. En önemli sakıncası ise hematolojik toksisitesi ve tekrarlanan kullanımları ile kemik iliği ve kök hücre üzerindeki zararidir (42).

#### **Nükleozid Analogları:**

İlk tedavi olarak FLD kullanan olgularda yanıt daha önce tedavi görmüş olan olgularda elde edilenin iki katına yakındır. Yaş, Rai evresi, 11 g/dL nin altında hemoglobin, diploid karyotip,  $\beta$ 2M düzeyleri, renal fonksiyonlar primer tedavide FLD kullanımından sonraki prognoz için önemli görülmüştür. Başlangıç çalışmalarında alkilleyicilere dirençli veya nüks eden olgularda FLD en iyi ikinci ajan olarak ortaya çıkmıştır.

FLD+mitoxantron kombinasyonunun tek başına FLD'e üstünlüğü olmadığı bildirilmiştir (43). Prednisolon ile birlikte kullanıldığında ise tek başına FLD'e göre sağ kalım sürelerinde bir iyileşme olmadığı ve daha fazla enfeksiyon oluştuğunu belirleyen yayınlar mevcuttur. Buna karşılık FLD içeren kombinasyonlar arasında en iyisinin FLD ve siklofosfamid kombinasyonu olduğu ileri sürülmektedir. Birlikte kullanımları ile daha önceden FLD'e refrakter olduğu bilinen olgularda %39 (%3 tam yanıt), FLD'e refrakter olmayan olgularda ise %80 yanıt (%12 tam yanıt) bildirilmiştir.

Cladribine(2-Chlorodeoxyadenosine-2CDA), fludarabinden sonra en fazla uygulanmış olan purin analogu olmakla birlikte elde edilen deneyimin FLD ile elde edilene göre çok daha az olduğu bir gerçektir. Yaklaşık 450 olguyu kapsayan faz I ve faz II çalışmalarda %14'ü tam remisyon olmak üzere %48 oranında yanıt görüldüğü bildirilmektedir (43).

### **Monoklonal Antikorlar:**

**Ritüksümab:** KLL de onaylanmış ilk monoklonal antikor rituksimab'dır. Nötrofil sayısı veya T hücre seviyesine belirgin etkisi yoktur, normal poliklonal B hücrelerine etki eder. Lenfomaya göre KLL'de daha düşük sonuçlara neden olmuştur. KLL'de hem CD20 antijen ekspresyonunun foliküler lenfomaya göre daha düşük düzeyde oluşu hem de solubl CD20 varlığı nedeniyle etkinliği azalmaktadır. Lenfoma olgularında kullanılan dozlarda (375mg/m<sup>2</sup>) kullanıldığında KLL'de %13-36 arasında yanıtla yol açar. Daha yüksek dozlarla yanıt oranında artıştan söz edilmektedir. Rituximab ile fludarabin ve siklofosfamidin kombine kullanıldığı çalışmalarda daha önce tedavi görmemiş olgularda %57 oranında tam yanıt, %20 nodüler kısmi yanıt (toplam yanıt %94) tanımlanmıştır. Önceden tedavi görenlerde ise %14 tam, %56 kısmi yanıt bildirilmiştir (44).

**Alemtuzumab (Campaht-1H):** Konjuge edilmemiş insan anti-CD52 monoklonal antikorudur. Klinik araştırmalarda farklı hasta gruplarında çalışılmış olmakla birlikte endikasyonu alkilleyiciler ve FLD yanıtızsız olgularla sınırlıdır.

### **Kombine kemoterapi:**

En sık kullanılan kombine kemoterapi protokolleri COP ve CHOP rejimleridir. Binet C evresinde bulunan 70 olguda karşılaştırılmış medyan sağ kalım CHOP ile 62 ay bulunurken COP ile 22 ay olarak bulunmuştur (45). Binet B veya C evresinde bulunan olguların yer aldığı ve kombine KT rejimlerinin (CHOP, COP, CLB+Epirubicin) tek başına veya prednisolon ilaveli CLB ile karşılaştırıldığı ve toplam 2035 olguyu kapsayan 10 değişik çalışmanın metaanalizinde CHOP ile bazı serilerde daha fazla yanıt elde edildiğinin görülmesine karşılık genel olarak bu kombinasyonların CLB'e göre daha fazla bir sağ kalım avantajı sağlamadıkları bildirilmiştir (43).

### **Kök Hücre Nakli:**

Allojenik kök hücre nakli için halen çok iyi tanımlanmış prognoz kriterleri yoktur. Avrupa Kemik İliği Nakli Birliği'nin önerilerine göre; purin analogu içeren tedavilere yanıtızsız veya 12 aydan önce relaps olan hastalar, purin analogu kombinasyonu içeren tedaviler veya otolog kemik iliği transplantasyonu sonrası relaps, p53 delesyon/mutasyonu olup tedavi gerektiren hastalar kemik iliği nakli için adaydırlar (46).

## 2.2. Apoptozis

Apoptozis enerji bağımlı olan ve genler tarafından kontrol edilen programlanmış fizyolojik bir süreçtir. Belirli morfolojik ve fizyolojik değişimlerle karakterize edilir. Morfolojik değişimler; nükleer kondensasyon, hücre büzülmesi, membran şişmesi gibi değişimleri kapsarken, fizyolojik değişimler; spesifik endonükleazlarla DNA'nın 80-200 bazlık oligonükleotid fragmentlerine parçalanması, kaspazların aktivasyonu sonucu proteinlerin sindirilmesini kapsamaktadır (47).

Apoptotik hücre ölümü indüksiyon, efektör ve yıkım fazı olmak üzere 3 fazdan meydana gelmektedir. İndüksiyon fazında hücre apoptotik uyarı alır ve geri dönüşümsüz bir şekilde ölüm fazına yönlendirilir. Bunu ATP ve diğer hücresel bileşenlerin durumunda meydana gelen değişimleri kapsayan mitokondriyal işlevlerin modifikasyonları, hücre içerisinde nükleer kromatinin yoğunlaşması, sitoplazmik kısalma, membran şişmesi, nükleer fragmentasyon ve apoptotik yapıların oluşması ile hücre yapısında belirgin morfolojik değişimler ile karakterize edilen bir efektör faz takip eder. Yıkım fazında ise makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından apoptotik yapıların yıkımının ve fagositozlarının meydana geldiği hedef hücrenin büyük çaplı yıkımı gerçekleşir (48).

### 2.2.1. Apoptotik Hücre Ölümünün Moleküler Mekanizmaları

İki temel sinyal yolağı üzerinden aktifleşmekte ve pek çok protein tarafından regüle edilmektedir.

- 1) Hücre dışından tetiklenen, pozitif (TNF  $\alpha$  varlığı) ya da negatif (büyüme faktörü yokluğu) ekstrensek yol.
- 2) Hücre içinde DNA hasarı, endoplazmik retikulum stresi ya da mitokondriden tetiklenen intrinsek yol.

İster hücre içi ister hücre dışı mekanizmayla başlamış olsun, apoptotik süreç kaspazlar adı verilen proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir. Proteolitik olaylarda kalpainler, katepsinler ve proteazom gibi pek çok proteazın etkisi bilinse de asıl rol oynayanlar kaspazlardır. Kaspazlar, sitoplazmada inaktif proenzimler halinde bulunan, aktif katalitik bölgesinde sistein içeren ve substratlarını aspartat içeren özgül bir bölgeden kesen proteaz enzimlerdir. İki ana grupta incelenbilirler.

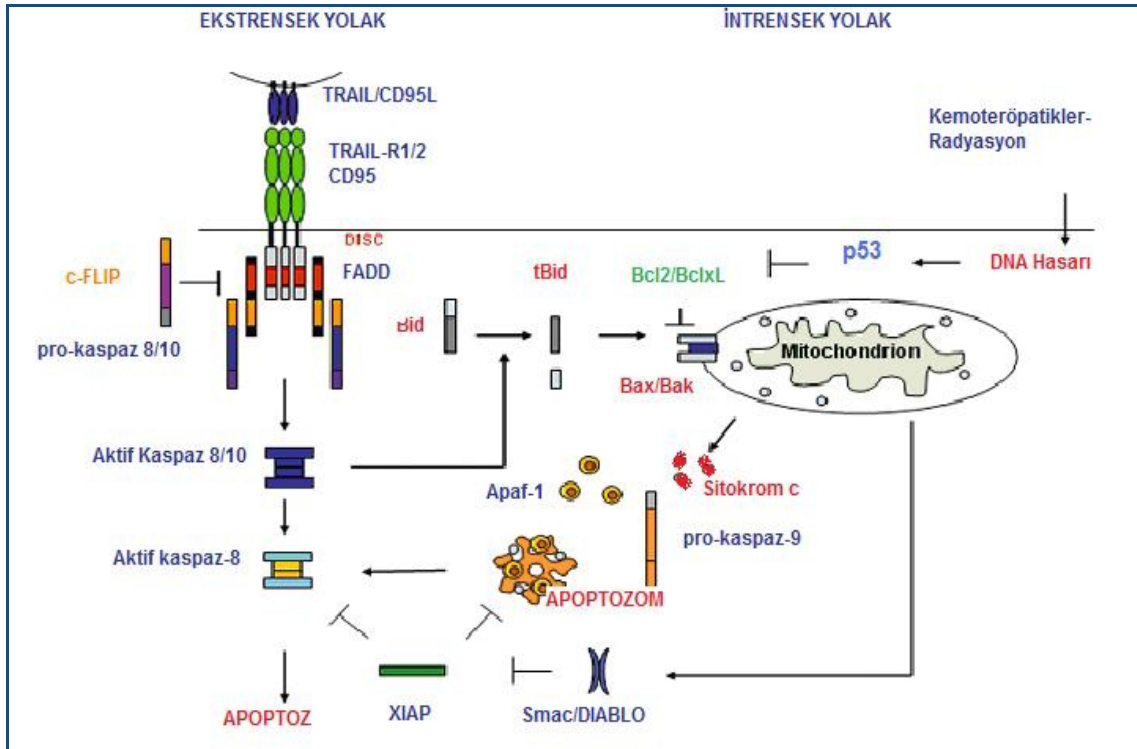
**Başlatıcı (initiator) kaspazlar (kaspaz-2,-8, -9, -10):** Çeşitli hücre içi ya da hücre dışı sinyalleri proteolitik aktiviteye çevirerek kaspaz kaskadının başlatılmasından sorumlu olan kaspazlardır. Kaspaz-8 ekstrensek yolağı, kaspaz-9 ise intrinsek yolağı başlatarak kaspaz kaskadını tetiklerler.

**Cellat (executioner) kaspazlar (kaspaz-3,-6,-7):** Hücre içerisindeki spesifik polipeptid hedeflerini proteolitik olarak keserek apoptoz mekanizmasının tamamlanmasını sağlayan enzimlerdir.

### 2.2.1.1 Ekstrensek Yol

Hücre dışı bir sinyalin plazma membranına bağlı reseptörler aracılığıyla apoptotik aktiviteye dönüşmesi olarak tanımlanmaktadır ve ölüm reseptörleri (death receptor) yolağı olarak da bilinmektedir. Apoptozun ekstrensek yolağında önemli rol üstlenen ölüm reseptörleri; TNF'nin (TNF- $\alpha$ , TNFSF2), FasL'in ve TNFr-apoptoz-tetikleyici ligandın (TNFr-Apoptosis-Inducing Ligand-TRAIL) bağlandığı reseptörlerdir. Apoptozu tetikleyebilen TNFr üyeleri ekstrensek yolak başlatıcı kaspazlarını (kaspaz-8,-10) bağlayarak kaspaz kaskadını tetiklerler (49).

TNF ailesi, reseptör proteinlerin hücre dışı bölgelerine bağlanarak etki göstermektedir. TNF ailesinde 19 farklı ligand bulunmaktadır ve bu ligandlar TNF reseptör ailesine ait 29 farklı reseptöre bağlanmaktadır. TNF reseptör ailesinin apoptozu tetikleyebilen alt sınıfına ait proteinler ölüm bölgesi (Death Domain- DD) adı verilen oldukça korunmuş 80 amino asitlik bir sekansı içermektedirler. Ligandın ölüm reseptörüne bağlanmasından sonra reseptörün yapısında meydana gelen konformasyonel değişim, ölüm-tetikleyici sinyal kompleksi (Death Inducing Signaling Complex-DISC) adı verilen protein kompleksinin oluşmasını sağlar. TRAIL ligandının ölüm reseptörlerine bağlanması da benzer şekilde gerçekleşmektedir. Ligand bağlı Fas reseptörüne ya da TRAIL bağlı ölüm reseptörüne Fas-ilişkili DD (Fas-Associated Death Domain-FADD) adı verilen adaptör protein komplementer DD üzerinden bağlanır. FADD başlatıcı kaspazlara (kaspaz-8, -10) komplementer DED bölgesi üzerinden bağlanır. DISC kompleksinin oluşumu tamamlandıktan sonra kaspaz -8, -10 oto-proteolitik aktivite ile aktifleşir ve kompleksten ayrılarak sitoplazmaya geçer. Aktifleşmiş kaspaz -8 ve -10 cellat kaspazları (kaspaz-3 ve -7) keserek aktifleştirir. Ayrıca kaspaz -8 ve -10 ekstrensek ve intrinsek yolakları BCL-2 ailesinin grup III proteinlerinden Bid proteinini keserek birbirine bağlar. Kesilerek aktifleşen Bid (tBid) mitokondri dış membranının geçirgenliğini etkileyerek sitokrom c (cyc) salınımına neden olur ve apoptozun intrinsek yolağını aktifleştirir (Şekil 1) (50).

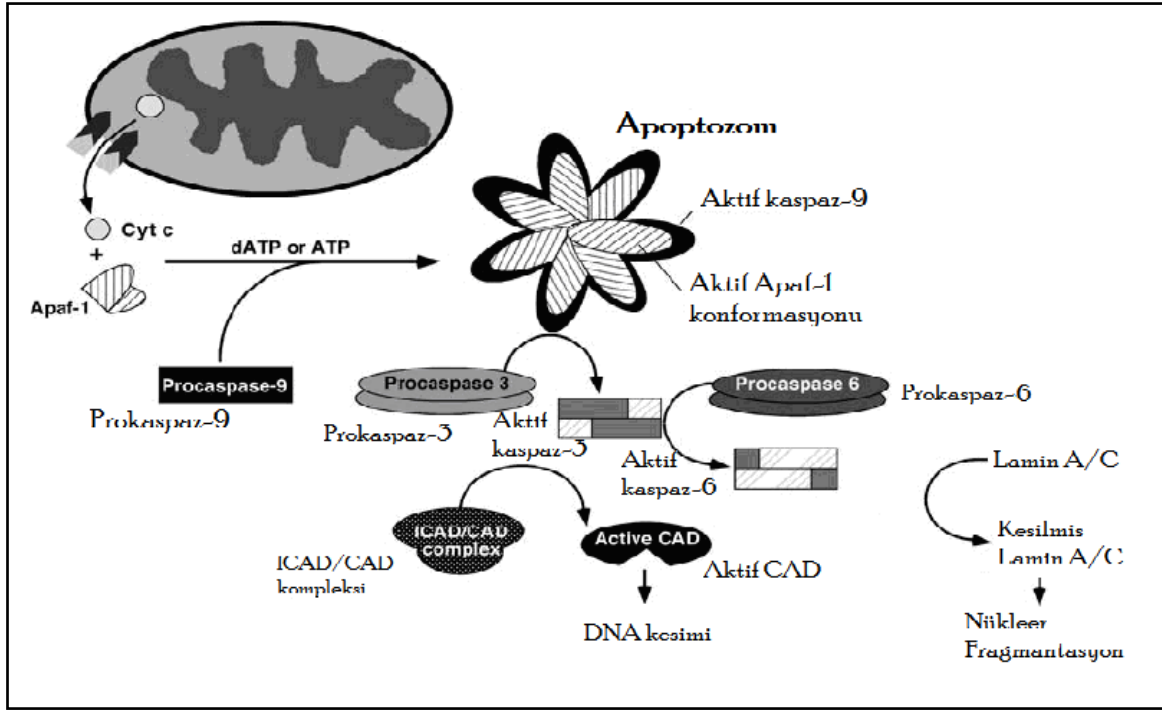


Şekil 1. Apoptoz ekstresek yolağının intrensek yolağı aktivasyonu)

### 2.2.1.2. İntrensek (mitokondriyal) Yol

Çeşitli sinyaller tarafından mitokondri dış membranının geçirgenliğinde değişim olması sonucunda kaspaz-9' un aktifleşmesi ile sonuçlanan apoptotik aktivasyon sürecidir. Bu süreçteki en kritik basamak, mitokondri membranlar arası alanda bulunan bazı peptidlerin mitokondriden sitoplazmaya salınmalarıdır. Membranlar arası bölgeden salınan proteinler arasında en çok, elektron transport sisteminin bir bileşeni olan ve normal koşullarda mitokondri iç membranına zayıf bağlanmış konumda bulunan, cyt c araştırılmıştır. Apoptotik süreçte mitokondriden cyt c salınması hızlı, kantitatif bir süreçtir ve kaspaz-9 aktivasyonu üzerinden apoptozun tetiklenmesine neden olur. Cyt c sitoplazmaya geçtikten sonra öncelikle adaptor Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) proteinine bağlanır. Bu bağlanma sonucu protein kompleksinde ATP bağımlı bir konformasyonel değişim meydana gelir ve prokaspaz-9 yapıya katılır. Sonuçta oluşan kompleks, çoklu Apaf-1 ve kaspaz-9 moleküllerini içerir ve "Apoptozom" olarak adlandırılır. Bu kompleksin etkisiyle aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktifleştirerek intrensek yolak üzerinden apoptozun tetiklenmesine neden olur (Şekil 2) (51,52).





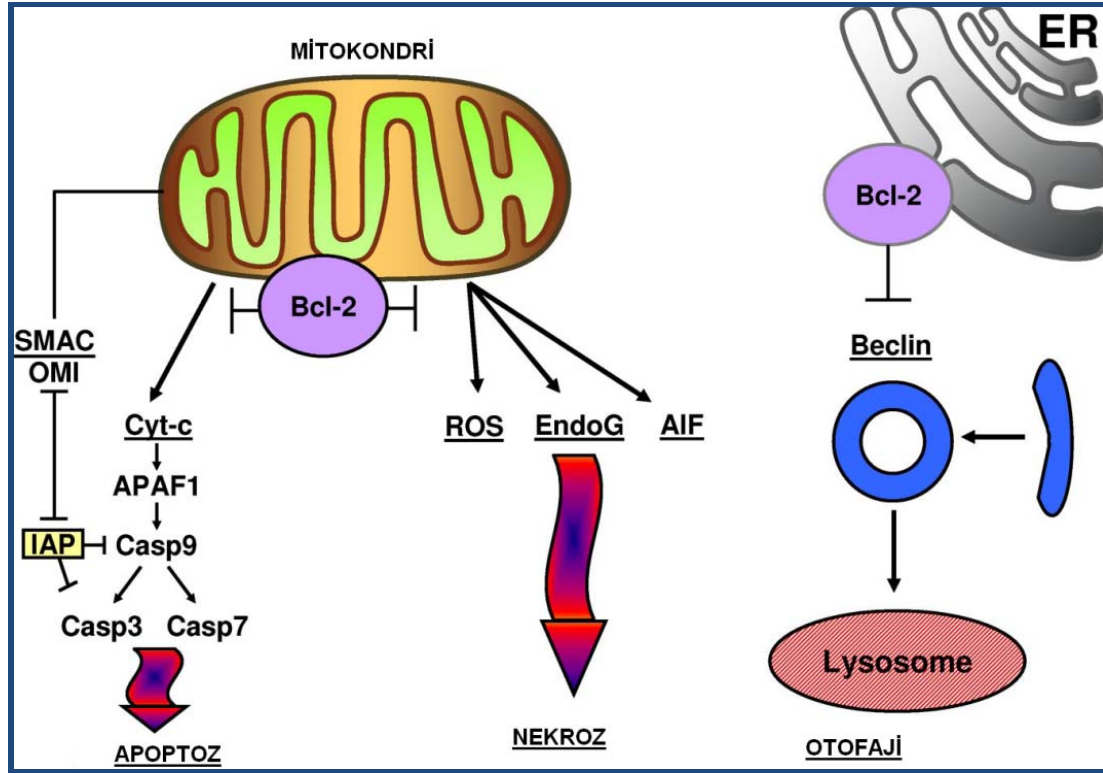
**Şekil 2.** Apoptozun intrinsek yolağı. Mitokondriden sitoplazmaya salınan sitokrom c, Apaf-1'e bağlanır ve bu olay proteinde ATP-bağımlı konformasyonel bir değişime neden olur. Bunun sonucunda oluşan apoptozom kompleksi kaspaz-9'u aktifleştirerek apoptozu tetikler.

İntrinsek yolakta rol alan ana organel mitokondridir. Moleküler kompozisyonu net olarak aydınlatılmamış olmasına karşın mitokondrial geçiş porlarının (Mitochondrial Permeability Transition, MPT) hücre ölümünde önemli rol oynadığı savunulmaktadır. Mitokondrinin iç-dış membranlar arası bölgesinde yerleşim göstermektedir. Cyt c normal şartlarda iç mitokondrial membranda anyonik bir fosfolipid olan kardiolipin ile elektrostatik etkileşime girerek membrana tutunmaktadır. Kardiolipinin oksidasyonu ile Cyt c'nin bağlanma ilgisinin azaldığı belirlenmiştir. Reaktif oksijen türevleri (ROT) tarafından kardiolipinin Cyt c'nin sitozole salınımında önemli rolü olduğu savunulmasına karşın BAX pro-apoptotik proteini olmadan sadece ROT' ların etkisi ile hücre ölümünün gerçekleşmediği özellikle dış mitokondrial membranın geçirgenliğinin artmasında BAX proteinin rol oynadığı savunulmaktadır. Dış mitokondrial membran geçirgenliğinin artması için gerekli olan BAX ve Bak proteinleri olmayan farelerin pek çok apoptoz tetikleyici ajana karşı dirençli oldukları bilinmektedir (53).

Bu süreci başlatan cyt c nin mitokondriden sitoplazmaya geçişinin temeli BCL-2 ailesi proteinlerinin cyt c salınmasındaki fonksiyonları üzerinde odaklanmaktadır.

### 2.2.2. Apoptoz ve BCL-2 Ailesi

BCL-2 keşfedilen ilk ölüm-karşıtı gen olup, BCL-2 protein ailesi, apoptoz, nekroz ve otofaji dahil olmak üzere tüm majör hücre ölümü çeşitlerini regüle eder. Yetişkinlerde doku hemostazından sorumlu olan yollar anlamlı ölçüde BCL-2-protein ailesi tarafından yönetilir (Şekil 3) (54).

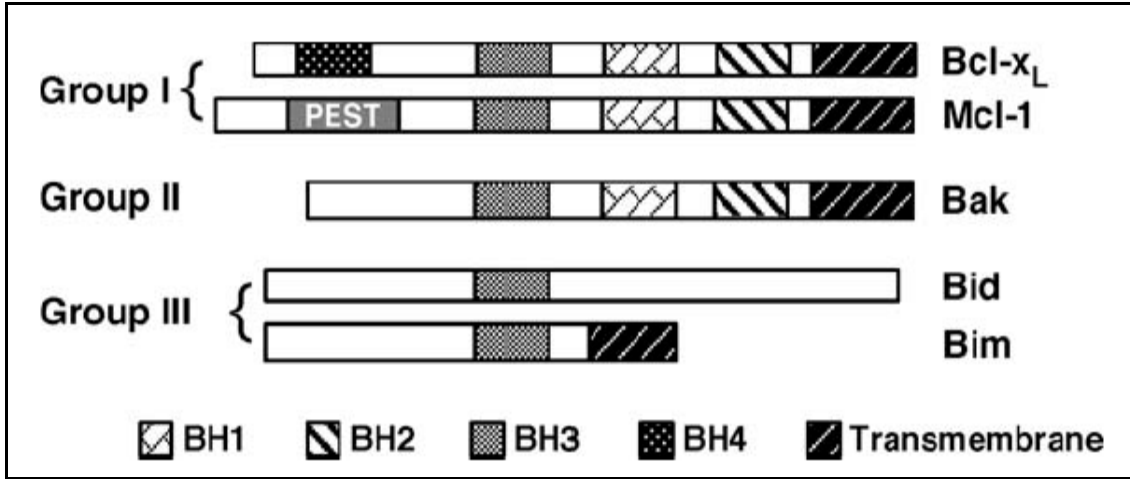


Şekil 3. BCL-2 apoptoz, nekroz ve otofajiyi baskılamaktadır. ROS reaktif oksijen türlerini göstermektedir, Cyt-c, sitokrom-c; EndoG, endonükleaz G; AIF, apoptoz-indükleyici faktör ve IAP, apoptoz proteininin inhibitörü (54).

BCL-2 ailesi proteinleri mitokondriden cyt c salınmasını kontrol eden bir protein ailesidir. Fonksiyonel ve yapısal kriterler göz önünde bulundurulduğunda, üç farklı grup halinde incelenebilir.

- Anti-apoptotik özellik gösteren grup I (BCL-2, BCL-xL, BCL-w, MCL-1, A1/Bfl1, Boo/Diva, Nrf3 ve BCL-B),
- Pro-apoptotik özellik gösteren grup II (BAX, Bak, Bok/Mtd)
- Pro-apoptotik özellik gösteren grup III (Bid, Bak, Bik, Bim, Blk, Bmf, Hrk, Bnip3, Nix, Noxa, PUMA ve BCL-G).

Anti-apoptotik grup I üyeleri genellikle oldukça korunmuş dört BH bölgesini (BCL-2 homolojisi) ve mitokondri dış membranı, endoplazmik retikulum membranı gibi çeşitli hücre içi membran yüzeylerine bağlanabilmelerine olanak sağlayan c terminal transmembran bölgesini içermektedirler. Pro-apoptotik grup II üyeleri ise N terminal BH4 bölgesi dışında tüm diğer BH bölgelerini ve transmembran bölgesini içermektedirler. Grup III üyeleri diğer gruplara göre oldukça heterojendir ve tek ortak homolojileri 15 amino asitlik BH3 bölgesidir (Şekil 4) (55).



**Şekil 4.** BCL-2 ailesi üyelerinin şematik gösterimi. Anti-apoptotik grup I üyeleri 4 BH bölgesini (MCL-1 hariç) ve transmembran bölgeyi içerirler. Pro-apoptotik grup II üyeleri BH4 hariç tüm BH bölgelerini ve transmembran bölgeyi içermektedirler. Grup III üyelerinde ise sadece BH3 bölgesi ortaktır. Bu bölge dışında oldukça heterojen bir dağılım göstermektedirler (55).

### Grup I

Grup I proteinlerinin anti-apoptotik etkilerini açıklamaya yönelik yapılan ilk teori grup I proteinlerinin BAX ve Bak proteinlerine bağlanarak bu proteinleri etkisizleştirdiklerini ve böylece cyt c salınmasını engellediklerini öne sürmüştür. Bir diğer teori, BCL-2 proteininin hücrelerdeki antioksidan kapasiteyi artırarak apoptozu engellediğini öne sürmektedir. Üçüncü teori BCL-2 proteininin endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınmasını inhibe ederek apoptozu engellemesine dayanmaktadır. BCL-2 tarafından inhibe edilen tüm apoptotik tetiklemelerde kalsiyum salınmasının söz konusu olmadığını belirlenmesi bu mekanizmanın da BCL-2 proteininin anti-apoptotik fonksiyonunun açıklanması açısından tek başına yetersiz kalmasına neden olmuştur. Son olarak grup I üyelerinin grup III üyeleri ile etkileşerek cyt c salınmasını ve dolayısıyla da apoptozu engelledikleri hipotezi öne sürülmüştür.

Yapılan çalışmalar grup I üyelerinin BH3 bölgesi üzerinden grup III üyelerine bağlanabildiklerini ortaya koymaktadır. Bu farklı teorilerin her birinin kısmen doğru olduğu söylenebilir. Fakat grup I proteinlerinin tanımlanmış olan anti-apoptotik fonksiyonlarını net olarak açıklayan bir model henüz öne sürülmemiştir.

## **Grup II**

Güncel bilgiler başta BAX ve Bak olmak üzere grup II üyelerinin doğrudan cyt c salınmasını sağladığını göstermektedir. BAX ve Bad proteinlere ait genlerden herhangi birinin delesyonu apoptozu kısmen, her iki proteine ait genlerin birlikte delesyonu ise apoptozun tamamen engellenmesine neden olmaktadır. Bu sonuçlar apoptozun intrensek yolağında bu iki proteinin bir arada gösterdikleri etkinin önemini ortaya koymaktadır. BAX proteini apoptotik olmayan hücrelerde sitoplazmada ya da mitokondri yüzeyine zayıf bağlı halde bulunmaktadır. Apoptoz tetiklendiğinde ise BAX mitokondri dış membranına transloke olmakta ve bu durum BAX'ın konformasyonunda değişime ve oligomerizasyonuna neden olmaktadır. Bak proteini ise normalde mitokondri dış membranında bulunurken apoptoz sırasında konformasyonel bir değişim geçirir ve membranın iç taraflarına geçmektedir. BAX ve/veya Bak proteinlerinin mitokondri dış membranında cyt c salınmasını sağlayacak porlar oluşturdukları düşünülmektedir (56).

## **Grup III**

BAX ve Bak proteinlerinin mitokondriye geçişi ve mitokondri membranında por oluşturmaları grup III proteinleri tarafından sağlanmaktadır. Grup III üyesi proteinlerin etkilerini iki temel mekanizma üzerinden gösterdikleri düşünülmektedir. Bim ya da tBid gibi grup III üyeleri BAX ile doğrudan etkileşerek proteinin membrana göçünü sağlamaktadırlar. PUMA, Bmf ve Bad gibi diğer grup III üyeleri ise anti-apoptotik grup I üyelerine bağlanıp onları etkisizleştirerek dolaylı yoldan apoptozun gerçekleşmesini sağlamaktadırlar (57).

Apoptoz ve tümör baskılanması arasındaki önemli bir bağlantı p53'ün direkt olarak BAX genine bağlandığı ve ekspresyonunu baskıladığını, böylelikle de bu önemli tümör baskılayıcı için ilk pro-apoptotik hedefin ortaya çıkartılmış olması ile kurulmuştur. Hemen ardından Bid, Puma ve Noxa dahil olmak üzere BCL-2 ailesinin birçok pro-apoptotik üyesinin p53'ün direkt hedefleri arasında olduğu gösterilmiştir. Pro-apoptotik BCL-2 ailesi geninde fonksiyon kaybettirici mutasyonlara ilişkin örnekler, ilk olarak kolon kanserlerinde, sonrasında ise hematopoietik malignitelere insan BAX geninin çalışılması ile ortaya konulmuştur (58,59).

Fareler ile yapılan çalışmalarda bu pro-apoptotik genin in vivo ortamda tümörogenezi baskıladığı görülmüş, BAX'ın bir tümör baskılayıcı olduğu kesinlik kazanmıştır (60). İnsan malignitelerinde BCL-2 protoonkogenini aktive eden veya BAX tümör baskılayıcı genini inaktive eden genetik değişiklikler hematopoietik sistemde BCL-2-ailesi proteinlerinin in vivo rollerine ilişkin önemli ipuçları vermiştir. BCL-2 ailesi proteinleri ile ilgili basit doku homeostazı bakımından şunlar gösterilmiştir:

- BCL-2 yetişkinlerde periferik lenfosit popülasyonlarının korunması için gereklidir (61).
- BAX yoksun farelerde lenfositoz gelişmesi bu pro-apoptotik proteinin olgun lenfositlerde programlanmış hücre ölümünde bir rolü olduğunu göstermektedir (62).
- Anti-apoptotik MCL-1 hematopoietik kök hücrelerin ve gelişmekte olan T ve B lenfositlerin sağkalımı, ayrıca olgun lenfosit hücre popülasyonlarının korunması için gereklidir (63,64).
- Bad-yoksun farelerde diffüz B hücreli lenfoma gelişir, bu da olgun B hücrelerinde bu pro-apoptotik proteinin tümör baskılayıcı bir rolü olduğunu akla getirmektedir (65).
- Farelerde yapılan gen knock-out çalışmalarında programlanmış hücre ölümündeki bozuklukların otoimmüniteyi güçlendirdiğini göstermektedir (66).

### 2.2.2.1. BCL-2

İnsan BCL-2 geni kısmi olarak ilk defa, non-Hodgkin lenfomalarda t(14;18) klonlanmıştır. Araştırmacılar in vivo olarak sürekli BCL-2 aşırı ekspresyonunun gecikmiş programlı hücre ölümünün bir sonucu olarak B-lenfositlerinin poliklonal akümülyasyonuna neden olduğunu ve ortak olarak t(14;18) translokasyonları içeren insan foliküler lenfomalarının histolojik özelliklerini özetlediğini göstermişlerdir (67).

BCL-2 gen yeniden düzenlemeleri büyük-hücreli non-Hodgkin lenfomalarda zayıf prognoz ile ilişkilendirilmiş ve yüksek BCL-2 protein düzeylerinin immünohistokimyasal tespit yöntemlerinin bulunmasını sağlamıştır (68,69). Çeşitli lenfoid hücre dizilerinde BCL-2'nin sürekli aşırı eksprese edilmesinin nükleozid analogları ve glikokortikoidlere direnç sağladığı gösterilmiş (70,71) ve timositlerde BCL-2'nin çeşitli hücre ölümü uyararı tarafından indüklenen hücre ölümünü önleyebileceği bulgusuna katkıda bulunulmuştur (72).

Yüksek BCL-2 düzeylerinin akut miyeloid lösemisi olan hastalarda kemoterapiye direnç ile ilişkili olduğunu ve BCL-2 mRNA'yı hedef alan antisens oligodeoksinükleotidlerin in vitro ortamda akut miyeloid lösemi hücrelerinin sitozin arabinozide duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir. Klinik korelatif çalışmalar BCL-2 ve hematolenfoid malignitelere kemo-direnç arasındaki ilişkiyi güçlendirmiş olup, prostat kanseri gibi bazı katı tümörlerde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. BCL-2 hedefli tedaviye ilişkin ilk faz I klinik çalışmada bir antisens fosforotioat oligodeoksinükleotid ile refrakter lenfoması olan hastalarda umut verici sonuçlar elde edilmiş ve BCL-2'nin nötralize edilmesinin apoptoz duyarlılığını malign hücrelerle sınırlandıracağı ve ölümlerini hızlandıracağı umudunu arttırmıştır (73,74).

KLL'de BCL-2 gen ekspresyonunun yüksek seviyelerde yapıldığı gösterilmiştir (75). B-hücrelerinde BCL-2 gen ekspresyonunun normalde endojen mikro RNA'lar (miR'ler) tarafından baskılandığı ve bu düzenleyici RNA'ları kodlayan genlerin KLL olgularının %70'inden fazlasında mutasyonlar ile silindiği veya inaktive edildiği tespit edilmiştir (76).

#### 2.2.2.2. MCL-1

1q21 kromozom bölgesinde lokalize olan MCL-1 geni tarafından sentezlenen prosurvival Miyeloid hücre lösemisi-1 (MCL-1) proteini normal hücrelerde proapoptotik BCL-2 ailesi üyelerine bağlanarak bu proteinleri inaktif durumda tutmaktadır ve hücrenin apoptoza gidişini engellemektedir. Bu proteinin ekspresyonunun azalması mitokondrial apoptoz yolağında dengenin proapoptotik proteinler lehine dönmesine ve hücrelerin apoptotik uyarılara daha duyarlı hale gelmesine neden olur. MCL-1 geni taşıyan farelerle yapılan in vivo çalışmalarda lenfoid ve myeloid hücrelerin yaşam süresinde kısalma ve zamanla B hücreli lenfoma insidansında artış görülmüş ve birçok hematopetik kanserde (KLL, B hücreli lenfoma, mantle hücreli lenfoma, multipl myelom) ayrıca hepatoselüler karsinom, küçük hücre dışı akciğer kanseri, testis kanseri, servix kanseri ve melanomda düzeyleri artmıştır (77,78).

MCL-1 ekspresyonuna katkıda bulunduğu düşünülen MCL-1 promotor bölge insersiyonu tespit edilen olan KLL hastalarında; kemoterapiye cevapsızlık, hızlı hastalık progresyonu, overval surveyde kısalma sonucuna ulaşılmıştır ve KLL hastalarında bilinen biyolojik prognostik belirteçler ve iyileşmiş sonuçlar ile daha düşük MCL-1 proteini ve mRNA düzeyleri arasında bir korelasyon ortaya koymuştur (79-81). Flavopiridol ve silvestrol gibi, KLL hücrelerinde MCL-1 proteininin ekspresyonunu hedef alan ajanların kombinasyon kemoimmünoterapisinde anlamlı yarar sağlayabileceği öngörülmüştür (82,83).

### 2.2.2.3. BAX proteini

BCL-2 ailesi üyelerinden proapoptotik bir protein olan, BCL-2 ile ilişkili X protein (BCL-2 associated X-protein, BAX), 21 kDa ağırlığında bir proteindir. BAX geni, 19. kromozom üzerinde 19q13.3-q13.4 pozisyonunda lokalize olmuş, altı ekzon ve üzerinde dört p53 bağlanma bölgesi bulunan bir promotor bölgeden oluşmaktadır (84,85).

BAX proteini BH1, BH2 ve BH3 bölgelerinde BCL-2'ye benzerlik gösterir ve proapoptotiktir. Diğer toksininin yapısal olarak tam benzeri olan BAX proteininin bazı bakteriyel toksinlerin por oluşturan proteinlerine benzerlik göstermesi en azından kısmen hücre içi zarlarda (mitokondri, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarı) kanallar oluşturma potansiyelleri olabileceğini düşündürür. BAX, BCL-2 ile heterodimerize ve kendisi ile homodimerize olur. BAX hücrede aşırı yapıldığında apoptotik ölüm artar iken BCL-2 aşırı yapıldığında BAX ile heterodimerize olur ve apoptotik ölüm baskılanır (84).

BAX geninin promotor ve kodlama bölgesindeki mutasyonlar protein ekspresyonunu ve fonksiyonunu etkilemektedir (86). Bazı çalışma sonuçları, BAX'ın p53-bağımlı kemoterapi indüklü apoptozda kritik bir rol oynadığını göstermektedir (85). Hematopetik hücre hatlarının yaklaşık olarak %20'si ve lenfomaların %10'u BAX geninde mutasyon barındırır (87). Düşük BAX ekspresyonu KLL hastalarında hastalık progresyonu, tedaviye direnç ve daha kısa sürvi ile ilişkilendirilmiştir ve. BAX'ın azalmış seviyedeki ekspresyonunun kemoterapik ilaçlara cevap vermemeye katkı sağladığı yönünde bulgular literatürde mevcuttur (88,89).

### 2.2.3. P53

1970'lerin sonlarında keşfedilen tümör supresör geni p53 (TP53) 17. kromozomun kısa kolu üzerinde 17p13 bölgesinde yerleşmiştir. Hücre siklusunun kontrolünde, programlı hücre ölümünde, DNA sentezi ve tamirinde rol oynadığı düşünülmektedir. Mesane, prostat, akciğer, lenfoma, servikal karsinoma, hepatoma ve nazofaranjial karsinoma gibi pek çok kanser türünün mutant p53 ile bağlantılı oldukları gösterilmiştir (90,91).

Normal p53 geni (wild tip), genetik hasar taşıyan hücrelerin çoğalmasını önleyen nükleer bir fosfoproteini kodlar. Bu protein normal hücrelerin çekirdeklerinde bulunan 393 aminoasitlik, 4–5 fonksiyonel kısım içeren intraselüler yoğunluğu düşük bir fosfoproteindir. Fizyolojik koşullarda P53 proteininin 6–20 dakika gibi kısa bir yarı ömrü vardır, immünohistokimya boyama ile saptanamaz ve normal hücre bölünmesinde rolü yoktur. Fakat özellikle DNA hasarı sonrası p53 proteini stabilize olur ve hücresel seviyeleri çok çabuk yükselir.

Posttranslokasyonel modifikasyonla aktive olan p53 hücre döngüsü arresti ve apoptozisi indükler. Wild tip P53 genetik hasara uğramış hücrelerin proliferasyonunu engelleyerek malign klonlar oluşmasını önler (92).

P53 yolağındaki defektleri araştırmanın önemi 17p delesyonu olan hastaların klinik seyrinde farklılık görülmesindedir. 17. kromozomun kısa kolundaki delesyonlar 17p13 bölgesinde lokalize p53 tümör süpresör gen mutasyonuna eşlik etmektedir. p53 gen değişikliklerinin B hücreli KLL nin klinik seyrinde önemli olduğu azalmış survey ve tedavi direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir P53 mutasyonu en fazla oranda fludarabine dirençli KLL hastalarında gözlenmiştir. Çalışmalar bu hastalarda p53 mutasyonundan bağımsız şekilde etki eden ilaçların ilk tedavi yaklaşımı olarak kullanımını açısından önemli olduğunu belirtmektedir (93,94).

#### **2.2.4. Tedavide Apoptoz Temelli Yaklaşımlar**

Tümör hücrelerinde anti-apoptotik BCL-2 familyası proteinlerinin overekspresyonu; dış mitokondrial membranın geçirgenliğini arttıran BAX/Bak proteinlerinin porlar oluşturması ile inhibe edilebilir. Çeşitli tedavi stratejilerinin temeli (iyonize radyasyon, etoposid ve arsenatlar) bu ilaçların reaktif oksijen türevlerini (ROT) arttırmasına dayanmaktadır. Oluşan ROT mitokondrial geçiş porlarında (MPT) modifikasyonlara neden olmakta ve por geçirgenliğini değiştirmektedir Etoposid ve arsenik trioksit'in Adenin Nukleotid Transport proteinin oksidatif modifikasyonuna ve böylelikle mitokondriden cyt c salınımına neden olduğu belirtilmiştir.

Küçük bir peptid olan ve anti-apoptotik proteinlere (BCL-2, BCL-XL ve BCL-w) bağlanan ABT-737'nin BCL-2 familyası proteinlerin protein-protein etkileşimini bozarak BAX porlarının oluşumuna yol açtığı bunun sonucunda da cyt c salınımının arttığı gösterilmiştir. ABT-737'un oral aktif türevi olan ABT-263 lenfoma, küçük hücreli akciğer karsinomu ve KLL hastalarında henüz klinik deneylerinin başındadır ve mekanistik deneylerden elde edilen veriler bu ajanlar için ümit vericidir. p53 ün işlevini düzeltmek için geliştirilen tedavi yaklaşımları arasında p53 ifade eden adenovirüs tedavileri, faz 3 aşamasında bulunmaktadır. P53 işlevini düzeltmek için kullanılan diğer yaklaşımlar arasında mutant p53 ün işlevsel biçime dönmesinin sağlanması ve yapımının artırılması hedeflenmektedir. Bu maddeler henüz klinik öncesi aşamada denenmektedir.



BCL-2 mRNA'sını hedef alan antisens oligonükleotidlerden ilki, Randomize faz 3 çalışmalarda KLL için umut vaat eden aktivite göstermiştir. BCL-2 araştırmasındaki bu translasyonel yaklaşımlar yeni bir sınıf anti-kanser ilaçların geliyor olabileceği yönündeki umutları arttırmaktadır (95).

### 2.3. TCL-1

T hücresi lösemi/lenfoma 1 (TCL-1) onkogeni, T hücreli prolenfositik lösemilerde 14q31.2'de kromozomal translokasyonlar ve inversiyonların hedefi olarak keşfedilmiştir. TCL-1 proteini hem nukleus hem sitoplazmada bulunur. Yapısının küçük moleküllerin transportunda görev aldığı gösterilmiştir (96,97).

TCL-1 ekspresyonu B ve T hücre difersasyonunda belli evrelerde görev alır ve lenfoid dokuya spesifiktir. Normalde, germinal merkez evresine kadar B hücrelerinde, prekürsör ve aktive T hücrelerinde eksprese edilmektedir. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, TCL-1'in deregülasyonunun olgun T hücresi lösemisi (T-PLL/T-KLL) ve B-KLL gelişiminde nedensel bir olay olduğunu göstermiştir (98).

TCL-1'in, T hücrelerinde kritik bir anti-apoptotik molekül olan Akt onkoproteininin bir koaktivatörü olduğu ve T hücrelerinde sürekli olarak Akt eksprese eden transgenik farelerde T hücresi lösemilerinin geliştiği rapor edilmiştir (97,99). Bu sonuçlar, Akt'nin T hücrelerindeki TCL-1-aracılı lenfomagenezden sorumlu olabileceğini göstermektedir. Ancak Pten'in homozigos delesyonu ile Akt nin kuvvetli şekilde aktive edildiği fare hücrelerinde B hücresi maligniteleri gelişmemekte (98) bu bulgu B hücrelerinde TCL-1 deregülasyonunun Akt aktivasyonundan farklı mekanizmalar aracılığıyla B-KLL'ye neden olabileceğini düşündürmektedir. Son yıllarda transgenik fare modellerinde yapılan çalışmalarda B-KLL'de NF-κB yolağının önemi gösterilmiş, hayvan modellerinde NF-κB yolağının B-KLL patojenezinde bir rolü olabileceği öne sürülmüştür (100).

### 2.4.CD20

33–37 kDa luk ağırlığında non glikolize fosfoprotein olan CD20 nin B hücrelerin aktivasyonu, proliferasyonu ve differansiyasyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Dört transmembran bölgeye sahip olan CD20'nin hem C hem de N-terminal bölgesi sitoplazma içinde bulunur. İlk yapılan deneyler, CD20'nin internalize olmadığı membrana sıkıca bağlı olduğu ve plazma içinde serbest olarak bulunmadığı fikrini destekler niteliktedir. İzleyen çalışmalarda, sağlıklı kontrollerde çok az miktarlarda da olsa plazmada dolaşan CD20 varlığı gösterilmiştir (101).

Farklı B hücre malignensilerinde hücre yüzeyindeki CD20 yoğunluğu farklılık gösterir. Çocukluk çağı B hücreli Akut lenfoblastik lösemili i vakalarının yarısında CD20 (+) liği saptanmıştır.

Matür B hücre malignensileri arasında CD20 ekspresyonunun en düşük olduğu grup KLL ve SLL dir. Hairy Cell lösemi, folliküler lenfoma, mantle hücreli lenfoma, marginal zon B hücreli lenfoma gibi matür B hücre neoplazisinde aşırı ekspresyon görülmüştür. CD20 B hücreli lenfomaların %90'ından fazlasında eksprese edilmektedir. Lenfoma ve KLL'de CD20'nin dolaşımında gösterilmesini kötü prognozla ilişkili bulan çalışmalar mevcuttur. Mansari ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada KLL hastalarında plazma örneklerinde yüksek düzeylerde rastlanmış, ileri evre KLL ve kısa survey ile ilişkili bulunmuştur (102).

## **2.5. CD52**

CD52, tüm lenfositler ile monositler üzerinde yüksek konsantrasyonda bulunurken granülositler, eritrositler, trombositler ve hematopetik kök hücreler CD52 antijenini eksprese etmemektedir. Hematopetik sistem dışında erkek üreme sisteminde de eksprese edilir. Lenfositlerde hücre başına 4500000 molekül bulunur. CD52 evrensel olarak hemen hemen tüm lenfoma hücrelerinde eksprese edilir. CD52 ekspresyonu KLL ve B hücreli NHL vakalarının tümünde gözlenmiştir. Normal ve malign B hücrelerine kıyasla normal ve malign T hücrelerinde daha yoğun olarak bulunur. Aynı şekilde düşük dereceli lenfomada agresif lenfomaya göre daha fazla eksprese olur. Bununla beraber bu malignensiler arasında CD52 ekspresyon düzeyleri değişiklik gösterebilir (103,104).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulunun 08.12.2009 tarih ve 41 karar numarasıyla onay almıştır.

#### 3.1. Olgular

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Hematoloji kliniğinde KLL tanısı konulmuş, FISH yöntemi ile sitogenetik değerlendirmesi mevcut olan 100 hasta çalışmaya alındı. Çalışma grubundaki hastaların tanısı; periferik yayma incelemesinde matür görünümlü lenfosit sayısının artışı, tam kan sayımında lenfosit sayısının  $5 \times 10^3/\text{mm}^3$  ün üzerinde olması, kemik iliğinin morfolojik incelemesinde lenfosit sayısının %30'dan fazla ve immunfenotipleme ile CD5,CD19, CD20, CD22, CD23 pozitifliği ve CD10 negatifliği ile konulmuştur. Bu çalışmada Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından KLL tanısı ile raporlandırılan kemik iliği biyopsi örneklerine ait parafin blokları kullanıldı. Kontrol grubu olarak Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Patoloji Kliniğinde değerlendirilen ve normoselüler kemik iliği olarak raporlanan 60 kemik iliği örneğine ait parafin blokları kullanıldı.

Olguların yaşı, cinsiyeti, fizik muayene bulguları, laboratuvar bulguları (tam kan sayımı, periferik yayma, LDH, Albumin, CRP,  $\beta 2\text{M}$ , İmmünglobulin değerleri), kemik iliği B lenfosit oranları, kemik iliği tutulum tipleri, abdominal ultrasonografi ile değerlendirilmiş karaciğer ve dalak boyutları, Flow sitometri sonuçları, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) perforomas skalası, RAİ evreleme sistemine göre evreleri, tedavi alan hastaların tedavi başlangıcına kadar geçen süreleri, tedavi endikasyonları, almış oldukları kemoterapiler, tedavi yanıtları, ortalama takip süreleri, en son mevcut durumları kemik iliği B lenfosit oranları kaydedildi.

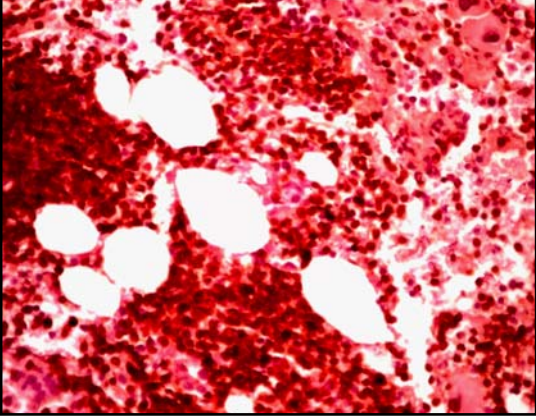
### 3.2. İmmünohistokimyasal İnceleme ve Değerlendirme:

TCL-1, MCL-1, BCL-2, BAX, P53, CD20, CD52 boyanması amacı ile KLL hastalarının ve normoselüler kemik iliği olarak değerlendirilen kontrol grubuna ait hastaların parafine gömülü bloklarından immünohistokimyasal inceleme için lizinli lamlara 5 µm kalınlıkta kesitler alındı. Otomatik yöntemle (VENTANA, Benchmark XT) TCL-1, MCL-1, BCL-2, BAX, P53, CD20, CD52 boyandı. Otomatik boyama yapılan kesitlere, primer antikor aşamasında TCL-1 için 1/50 oranında dilüe edilmiş konsantre antikor (SC3221 TCL-1 Antibody), MCL-1 için 1/50 oranında dilüe edilmiş konsantre antikor (SC 56152 MCL-1 Antibody), BCL-2 için 1/50 oranında dilüe edilmiş konsantre antikor (SC 56015 BCL-2 Antibody), Bax için 1/50 oranında dilüe edilmiş konsantre antikor (SC 7480 BAX Antibody), P53 için 1/50 oranında dilüe edilmiş konsantre antikor (SC 53297 P53 Antibody), CD20 için 1/50 oranında dilüe edilmiş konsantre antikor (SC 58985 CD20 Antibody), CD52 için 1/50 oranında dilüe edilmiş konsantre antikor (SC 51560 CD52 HI186 Antibody) uygulandı. Kesitler primer antikor ile 30 dakika inkübe edildi. Mayer Hematoksileni ile 30 s süreyle zıt boya yapıldı. Sonra sırasıyla %70'lik, %80'lik, %95'lik alkolde ve absölu alkolde 2'şer dakika tutuldu. Havada kurutulduktan sonra ksilolde 15 dakika tutulan kesitler entellan ile kapatıldı.

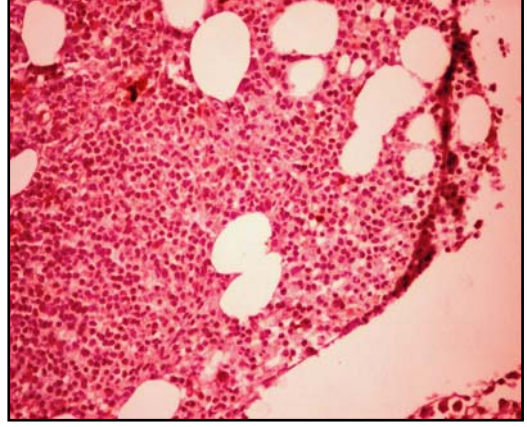
Histopatolojik değerlendirme aynı patoloji uzmanı tarafından yapıldı. HE ile boyanan preparatlar, ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

TCL-1 ve BAX ile boyanmanın değerlendirilmesinde neoplastik B hücrelerinin %20 den fazlasının diffüz sitoplazmik boyanması pozitif olarak kabul edildi. Neoplastik B hücrelerinin %20'nin altındaki boyanmaları ve boyanma olmayanlar negatif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak TCL-1 ve BAX için tonsil dokusu kullanıldı.

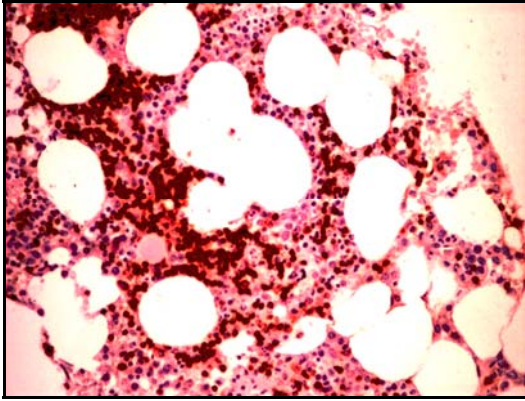
MCL-1 ve BCL-2 ile boyanmanın değerlendirilmesinde neoplastik B hücrelerinin %20 den fazlasının diffüz sitoplazmik ve nükleer boyanması pozitif olarak kabul edildi. Neoplastik B hücrelerinin %20'nin altındaki boyanmaları ve boyanma olmayanlar negatif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak MCL-1 için tonsil ve ince bağırsak, BCL-2 için tonsil dokusu kullanıldı (Resim 1-6).



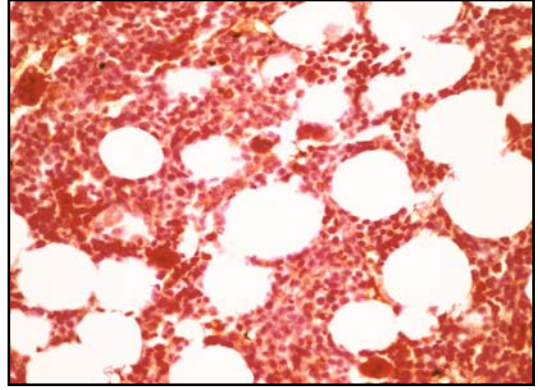
**Resim 1:** TCL-1 pozitif boyanan kemik iliği örneği



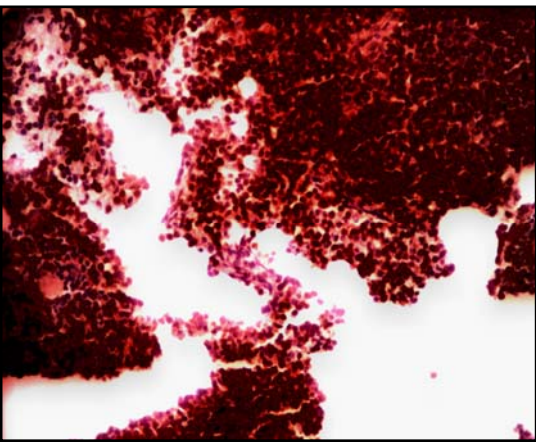
**Resim 2:** TCL-1 negatif boyanan kemik iliği örneği



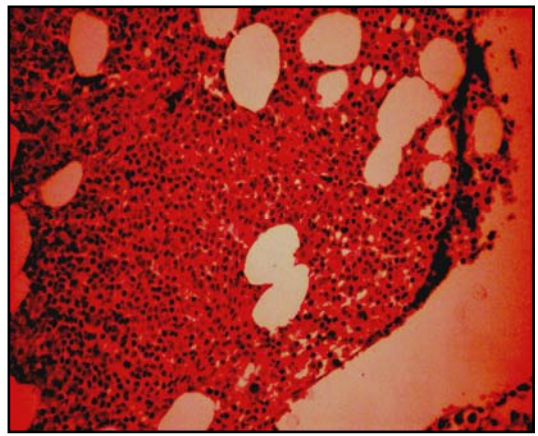
**Resim 3:** BCL-2 pozitif boyanan kemik iliği örneği



**Resim 4:** BCL-2 negatif boyanan kemik iliği örneği



**Resim 5:** BAX pozitif boyanan kemik iliği örneği



**Resim 6:** BAX negatif boyanan kemik iliği örneği

### 3.3 İstatistikî Analiz:

Çalışma sonuçlarının istatistiksel analizi için SPSS 15 paket programı içinde KLL'de TCL-1, BCL-2 ve BAX'ın klinik ve laboratuvar parametreleri ile karşılaştırılmasında pearson Ki-Kare testi ve gerektiğinde Fisher's Exact Test, erken evre KLL hastalarında 15 yıllık olaysız sağ kalım ve 15 yıllık toplam sağkalım ile klinik, laboratuvar ve immünohistokimyasal parametrelerin karşılaştırmasında Log Rank Test kullanıldı. Kaplan ve Meier metoduna göre sağ kalım analizleri uygulandı Ayrıca, Logistic regression modeli olan; Odds ratio (OR), %95 confidence interval (CI)'de hesaplandı.  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi.

Risk faktörlerinin önemini teyit etmek için Cox stepwise analizleri kullanıldı. Elde edilen sonuçlar hem kendi içinde hemde klinik parametrelerle (yaş, kemik iliği tutulum tipi, CD 38 düzeyi, TCL-1 ekspresyonu, 15 yıllık olaysız sağ kalım, 15 yıllık toplam sağkalım) karşılaştırılarak analiz edildi.

#### 4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 100 hastanın 56'sı erkek, 44 ü kadın olup medyan yaş 62 (32-83)'dir. RAI evreleme sistemine göre hastaların 28' i (%28) evre 0, 14'ü evre I, 37'si evre II, 7' si evre III, 14'ü evre IV olarak belirlendi. ECOG perfonmans skalası 0 olan hasta sayısı 35 (%35), 1 olan hasta sayısı 50 (%50), 2 olan hasta sayısı 13 (%13), 3 olan hasta sayısı 2 (%2), 4 olan hasta sayısı 0 (%0) idi. 54 hasta tedavisiz izlenirken (%54), 46 hasta takipleri döneminde tedavi almış (%46), bu hastaların 15 tanesi alkilleyici (%15) 31 tanesi ise fludarabin bazlı tedavi almıştır (%31). Hastaların medyan takip süresi 68.5 ay olarak tespit edilmiştir (Tablo 7).

**Tablo 7.** KLL Hastalarının Klinik Özellikleri

		Medyan	n %
Hasta sayısı			100
Yaş (medyan)		62 (32-83)	
Cinsiyet Erkek/Kadın			56 / 44
Evre (RAI)	0		28 (% 28)
	1		14 (% 14 )
	2		37 (% 37)
	3		7 (% 7)
	4		14 (% 14)
ECOG	0		35 (%35)
	1		50 (%50)
	2		13 (%13)
	3		2 (%2)
Tedavi	Alkilleyici		15 (% 15)
	Fludarabin bazlı tedavi		31 (% 31)
	Tedavisiz izlem		54 (%54)
İzlem Süresi (medyan ay)*		68.5 (8.8 -322.8)	

Hastaların hemoglobin miktarı, lökosit, lenfosit, trombosit sayıları sırası ile 13.2 gr/L (4.5–16.8), 37385  $\mu$ L (10460–278200), 29060  $\mu$ L (5090–260000), 195(6–518)  $10^3/\mu$ L idi. Onbir (%11) hastanın hemoglobin miktarı < 10 gr/L, 14 (%14) hastanın trombosit sayısı <100x10<sup>3</sup>/ $\mu$ L idi.

Hastaların CRP,  $\beta$ 2M, LDH, albumin, IgG, IgM, IgA değerleri sırası ile 3.65 mg/L (2.92–65), 3.7 mg/L (1.85-11.6), 386 IU/L (236-989), 4.32 gr/L (2.63-5.30), 10.85 (1.31-31.20) mg/L, 1.34 gr/L (0.16-5.3), 0.49 gr/L (0.14-1.28) idi. Periferik yayma lenfosit yüzdesi medyan %80 (40-96), kemik iliği lenfosit yüzdesi medyan %75 (30-95) idi. Hastaların kemik iliği tutulum tipi 54(%54) hastada nodüler, 46(%46) hastada diffüz patern göstermekte idi (Tablo 8).

**Tablo 8.** KLL Hastalarının Laboratuvar Özellikleri

		Medyan	n %
Hasta sayısı			100
Hemoglobin	gr/L	13.2 (4.5-16.8)	13.2
	< 10 gr/L		11 (%11)
Lökosit	$\mu$ L*	37385 (10460-278200)	
	>100/ $\mu$ L		13 (% 13)
Lenfosit	$\mu$ L*	29060 (5090-260000)	
	>100/ $\mu$ L		12 (% 12)
Trombosit	$10^3/\mu$ L*	195 (6-518)	
	<100x $10^3/\mu$ L		14 (%14)
CRP	mg/L	3.65 (2.92-65)	
$\beta$ 2-mikrogloblin	mg/L	3.7 (1.85-11.6)	
LDH	IU/L	386 (236-989)	
Albumin	gr/L	4.32 (2.63-5.30)	
IgG	gr/L	10.85 (1.31-31.20)	
IgM	gr/L	1.34 (0.16-5.3)	
IgA	gr/L	0.49 (0.14-1.28)	
Periferik yayma % lenfosit		80 (40-96)	
Kemik iliği % lenfosit		75 (30-95)	
Kemik iliği tutulum tipi	Nodüler		54 (% 54)
	Diffüz		46 (% 46)
* =medyan			

FISH sonuçlarına göre hastaların 3(%3) tanesinde 17p 13.1 p53, 7 (%7) tanesinde 11q 22.3 ATM, 25 (%25) tanesinde 13q 14.3, 6 (%6) tanesinde Cep12(D12Z3) anomalisi mevcuttu. 13q 34 anomalisi hiçbir hastada tespit edilmemişti. 100 hastaya ait kemik iliği biyopsilerinin parafin bloklarından hazırlanan kesitlerin immünohistokimyasal boyamalarında 70 (%70) hastada TCL-1, 58 (%58) hastada BCL-2, 61(%61) hastada BAX pozitifliği tespit edildi.



MCL-1 pozitifliği ise hiçbir hastada tespit edilemedi. Toplam 41(% 41) hastada sitogenetik olarak anormallik tesbit edildi (Tablo 9).

**Tablo 9.** KLL Hastalarının Sitogenetik ve İmmünohistokimyasal Özellikleri

Hasta sayısı	Medyan	n %
		100
FISH		
17p 13.1 p53		3 (% 3)
11q 22.3 ATM 22.3		7 (% 7)
13q14.3		25 (% 25)
13q3.4		0 (% 0)
Cep12 (D12Z3)		6 (% 6)
İmmünohistokimya*		
MCL-1		0 (% 0)
TCL-1		70 (%70)
BCL-2		58 (% 58)
BAX		61 (% 61)

\* %20'nin üzerindeki boyama pozitif olarak değerlendirilmiştir.

TCL-1, BCL-2, BAX ekspresyonu ile yaş (65 altı ve üstü), cinsiyet, RAİ evresi, lökosit, lenfosit ve trombosit değerleri ile anlamlı ilişki görülmedi (Tablo 10).

Hastalar CRP değeri >5 mg/L ve <5 mg/L,  $\beta$ 2M değeri >3.5 mg/L ve <3.5 mg/L, LDH değeri >480 IU/L ve <480 IU/L, albumin değeri >3.5 gr/L ve <3.5 gr/L olan hastalar şeklinde gruplandırıldı. Tüm yukarıda tanımlanan hasta grupları ile TCL-1, BCL-2, BAX ekspresyonu karşılaştırıldığında aralarında anlamlı ilişki saptanmadı (Tablo 10).

Hastalar kemik iliği lenfosit oranı %40'ın üzerinde ve altında olan hastalar şeklinde gruplandırıldı. Her iki hasta grubu ile TCL-1, BCL-2, BAX ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmadı. Kemik iliği tutulum tipi ile (nodüler veya diffüz) TCL-1, BCL-2, BAX ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Tablo 10).

Hastaların sitogenetik özellikleri TCL-1, BCL-2, BAX ekspresyonu ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı ilişki saptanmadı (Tablo 10).

Hastaların akım sitometri sonuçları CD38 > %20 ve < % 20, ZAP 70 >% 5 ve < %5, FMC7 düzeyi >%20 ve <%20 olan hastalar şeklinde gruplandırıldı. TCL-1, BCL-2, BAX ekspresyonu ile aralarında anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 10).

**Tablo 10.** KLL’de TCL-1, BCL-2 ve BAX pozitifliğinin klinik ve laboratuvar parametreleri ile karşılaştırılması (n=100)

		TCL-1 <sup>a</sup>			BCL-2 <sup>a</sup>			BAX <sup>a</sup>		
		Odds Ratio	95 % Confidence Interval	p-value <sup>#,*</sup>	Odds Ratio	95 % Confidence Interval	p-value <sup>#,*</sup>	Odds Ratio	95 % Confidence Interval	p-value <sup>#,*</sup>
Yaş	<65 / ≥65	1.373	0.570-3.309	0.515*	1.568	0.694-3.543	0.310*	2.177	0.935-5.070	0.906*
Cinsiyet	K/ E	0.962	0.406-2.279	1.000*	0.390	0.170-0.898	0.041*	1.368	0.609-3.072	0.537*
Evre (RAI)	0-4			0.116 <sup>#</sup>			0.287 <sup>#</sup>			0.705 <sup>#</sup>
Lökosit				0.976 <sup>#</sup>			0.627 <sup>#</sup>			0.946 <sup>#</sup>
Lenfosit				0.866 <sup>#</sup>			0.645 <sup>#</sup>			0.788 <sup>#</sup>
Trombosit				0.510 <sup>#</sup>			0.249 <sup>#</sup>			0.750 <sup>#</sup>
CRP	>5/<5	0.806	0.313-2.082	0.806*	1.074	0.438-2.633	1.000*	0.734	0.300-1.797	0.500*
β2mikrogloblin	>3.5/<3.5	0.943	0.394-2.253	1.000*	1.602	0.714-3.595	0.305*	1.002	0.443-2.268	1.000*
LDH	<480/≥480	0.821	0.294-2.299	0.790*	0.957	0.361-2.531	1.000*	1.362	0.495-3.748	0.621*
Albumin	>3.5/<3.5	0.943	0.394-2.253	1.000*	1.602	0.714-3.595	0.305*	1.002	0.443-2.268	1.000*
K.İ. tutulum	N/D	0.706	0.296-1.681	0.514*	0.680	0.305-1.518	0.418*	1.417	0.632-3.177	0.418*
K.İ. lenfosit %	>40/<40	1.641	0.428-6.297	0.482*	1.432	0.387-5.302	0.738*	1.647	0.444-6.109	0.506*
17p 13.1 p53		0.853	0.074-9.781	1.000*	0.351	0.031-4.003	0.571*	0.308	0.027-3.520	0.559*
11q 22.3 ATM		2.719	0.313-23.622	0.671*	1.887	0.348-10.230	1.696*	1.652	0.304-8.966	0.702*
13q14.3		0.545	0.211-1.410	0.218*	2.250	0.841-6.018	0.160*	1.185	0.464-3.029	0.815*
Cep12(D12Z3)		2.231	0.249-19.956	0.665*	0.709	0.136-3.700	0.694*	0.621	0.119-3.243	0.676*
CD38	>20/<20	1.295	0.430-3.902	0.786*	1.068	0.396-2.879	1.000*	0.704	0.261-1.899	0.612*
ZAP70	>5/<5	1.029	0.185-5.730	1.000*	0.302	0.055-1.664	0.236*	0.536	0.112-2.571	0.456*
FMC7	>20/<20	1.088	0.428-2.764	1.000*	0.452	0.189-1.081	0.086*	1.261	0.530-3.000	0.662*

<sup>a</sup>, n=100 OR, Odds Ratio; CI, Confidence Interval; K/E, Kadın/Erkek; <sup>#</sup>Mann Whitney U test; \*Fisher's Exact Test

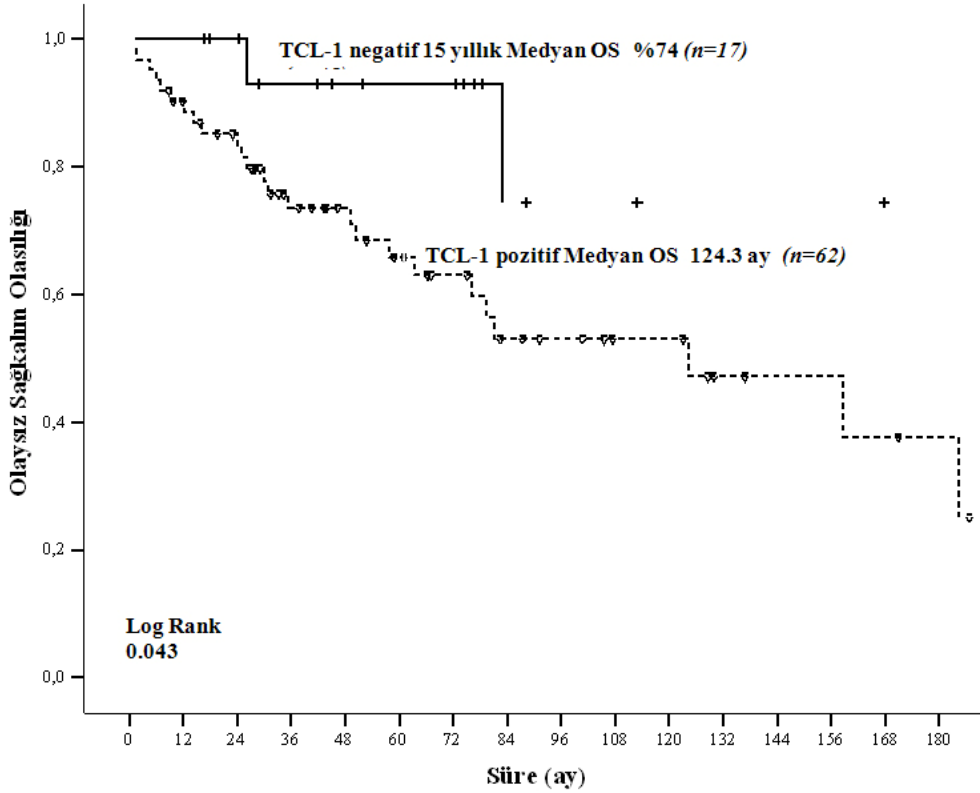
Erken evre KLL hastalarında (RAI evre 0,I,II) 15 yıllık toplam sağ kalım 93 ay, olaysız sağ kalım 158,6 ay olarak bulunmuştur. 15 yıllık toplam sağ kalım ile cinsiyet, yaş, RAI evresi (Evre 0,I,II-Evre 0-I,II), kemik iliği tutulum tipi, kemik iliği lenfosit yüzdesi, CRP, β2M, LDH, albumin, CD38, ZAP70 ve FMC7 ile arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunamamıştır. 15 yıllık toplam sağ kalım ile ayrıca sitogenetik özellikleri ve TCL-1, BCL-2, BAX ekspresyonu arasında istatistiksel bir anlam bulunamamıştır.

15 yıllık olaysız sağ kalım ile cinsiyet, kemik iliği lenfosit yüzdesi, CRP, β2M, LDH, albumin, ZAP70 ve FMC7 ile arasında istatistiksel anlam bulunamamıştır. 15 yıllık olaysız sağ kalım ile ayrıca hastaların sitogenetik özellikleri ve BCL-2, BAX ekspresyonu arasında istatistiksel bir anlam bulunamamıştır (Tablo 11).

65 yaş altı hastalarda 15 yıllık olaysız sağ kalım 124.3 ay, 65 yaş üstü hastalarda 15 yıllık olaysız sağ kalım 184.4 ay saptandı (p=0.036). RAI evre 0 olan 28 hastanın 15 yıllık olaysız sağ kalımı %71, evre I olan 14 hastanın 15 yıllık olaysız sağ kalımı 184.4 ay, evre II olan 37 hastanın olaysız 15 yıllık sağ kalımı 81.1 ay olarak saptandı (p=0.010).

RAİ evre 0–I olan 42 hastanın 15 yıllık olaysız sağ kalımı 184,4 ay, RAİ evre II olan 37 hastanın 15 yıllık olaysız sağ kalım 81,1 ay olarak saptandı ( $p=0.003$ ).

Kemik iliği tutulum tipi diffüz olan 34 hastanın 15 yıllık olaysız sağ kalımı 79.2 ay, kemik iliği tutulum tipi nodüler olan 45 hastanın 15 yıllık olaysız sağ kalımı 184.4 ay olarak saptandı ( $p=0.027$ ). CD38 değeri  $>20$  olan 15 hastanın 15 yıllık olaysız sağ kalımı 49.3 ay, CD38 değeri  $<20$  olan 42 hastanın olaysız sağ kalımı %60 olarak saptandı ( $p=0.000$ ). TCL-1 pozitif olan 62 hastanın 15 yıllık olaysız sağ kalımı 124.3 ay, TCL-1 negatif olan 17 hastanın 15 yıllık olaysız sağ kalımı %74 olarak saptandı ( $p=0.0043$ ) (Şekil 5) (Tablo 11).



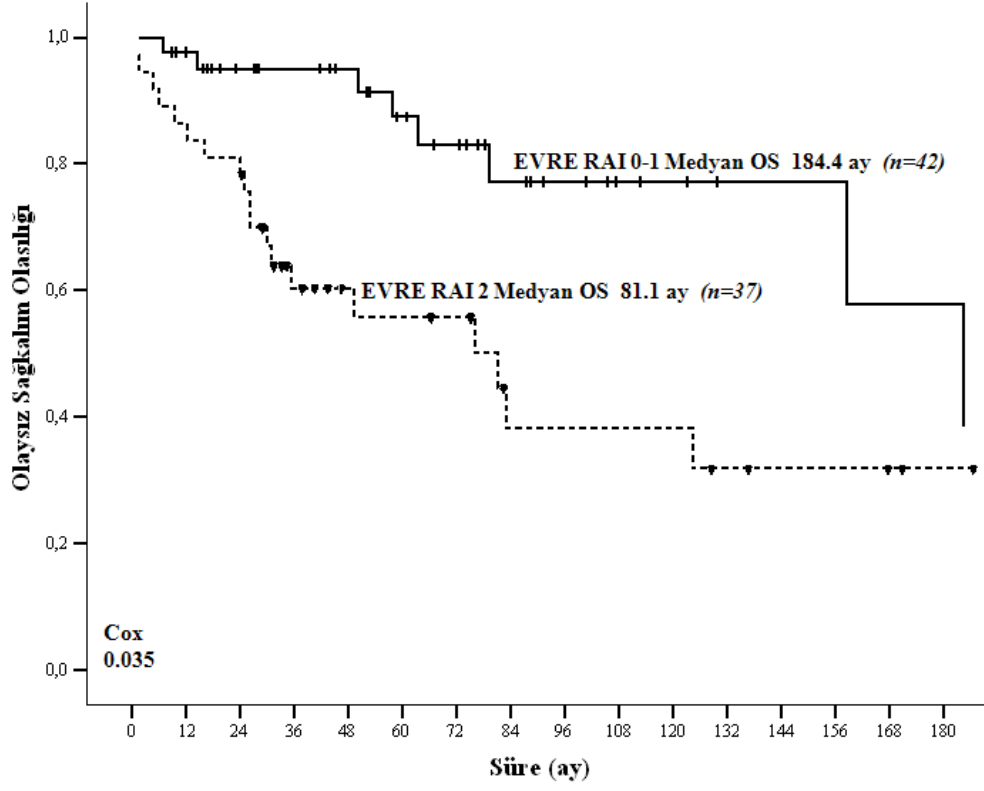
Şekil 5. TCL-1 pozitif RAİ evre 0,I,II hastalar ile Olaysız sağ kalım arasındaki ilişki

**Tablo 11.** Erken evre KLL’de TCL-1, BCL-2 ve BAX pozitifliği ile klinik ve laboratuvar parametrelerinin total sağ kalım ve olaysız sağ kalım üzerine etkisi (Tek değişkenli analiz/ Logrank test)

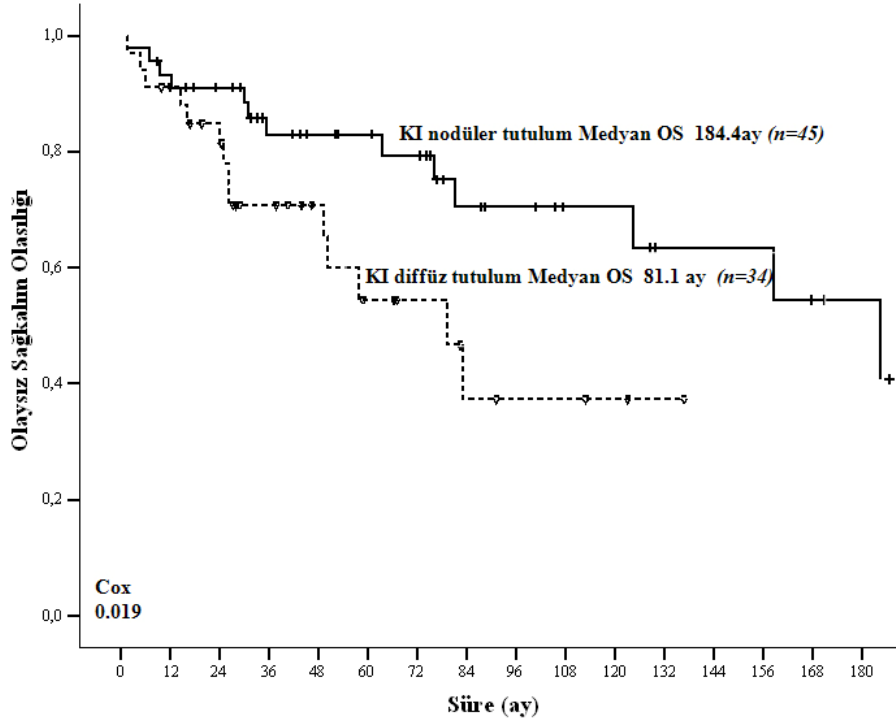
		n	Median OS mo (15 yr %)	Log Rank p-value	Median EFS mo (15 yr %)	Log Rank p-value
Hasta Sayısı		79	(93)		158.6	
Cinsiyet	Kadın / Erkek	36/43	(92) / (95)	0.539	83/158.6	0.714
Yaş	<65 / ≥65	48/31	(97) / (89)	0.239	124.3/184.4	0.036
Stage (RAI)	0	28	(92)		(71)	
	I	14	(91)		184.4	
X	II	37	(96)	0.899	81.1	0.010
Stage (RAI)	0-I	42	(91)		184.4	
X	II	37	(96)	0.702	81.1	0.003
Kemik İliği tutulum tipi	Diffüz / nodüler	34/45	(98)/(72)	0.112	79.2/184.4	0.027
Kemik İliği lenfosit %	>40/<40	70/9	(75)/(80)	0.311	124.3/(71)	0.334
β2-mikrogloblin	>3.5/<3.5	39/40	(97)/(88)	0.378	124.3/(62)	0.161
LDH (IU/L)	<480 / ≥480	65/14	(92)/(67)	0.952	184.4/79.2	0.055
C-reactive protein	>5/<5	16/63	(80)/(97)	0.125	124.3/184.4	0.907
(mg/L)						
Albumin	>3.5/<3.5	40/39	(84)/(97)	0.378	124.3/(62)	0.161
CD 38 X	>20/<20	15/42	(50)/(91)	0.962	49.3/(60)	0.000
ZAP70	>5/<5	5/57	(100)/(90)	0.654	35.4/124.3	0.073
FMC7	>20/<20	36/31	(80)/(79)	0.121	184.4/124.3	0.831
17p13.1 p53		3/76	(100)/(93)	0.733	(68)/158.6	0.874
11q 22.3 ATM		6/73	(100)/(93)	0.636	49.3/158.6	0.113
13q14.3		21/58	(90)/(95)	0.610	(60)/158.6	0.347
Cep12(D12Z3)		5/74	(100)/(93)	0.154	76/158.6	0.486
TCL-1		62/17	(95)/(90)	0.859	124.3/(74)	0.043
BCL-2		50/29	(93)/(90)	0.994	124.3/(72)	0.551
BAX		48/31	(89)/(100)	0.522	158.6/(52)	0.853

\* Median (year), OS: Total sağ kalım; EFS: Olaysız sağ kalım, LDH, Laktik dehidrogenaz.

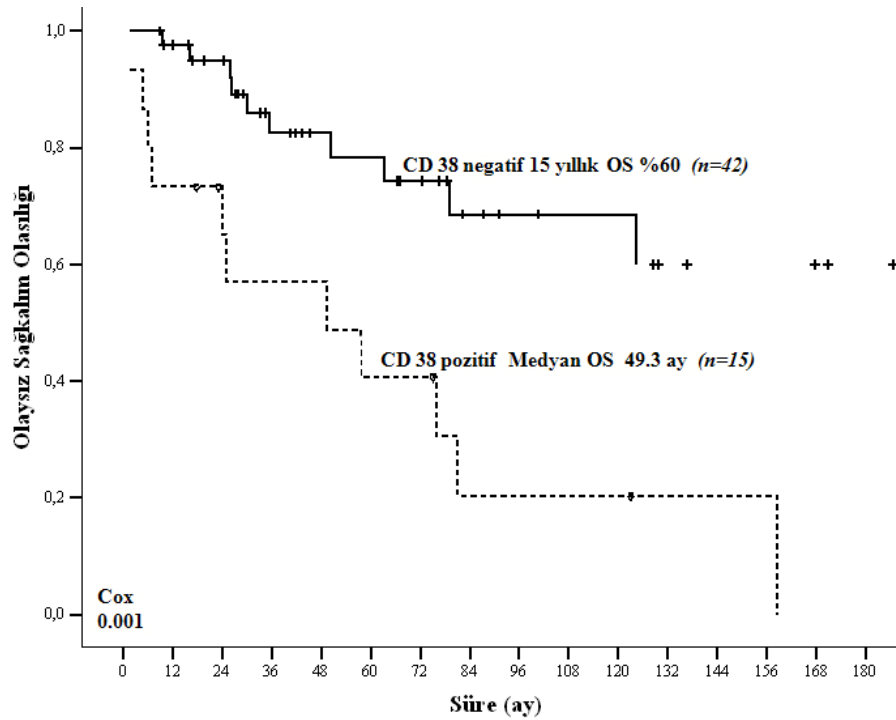
Değerlendirmeye alınan tek değişkenli analizde 15 yıllık olaysız sağ kalımı etkileyen yaş, evre (RAI 0-I,II), kemik iliği tutulum tipi, CD38, TCL-1 çok değişkenli analizde değerlendirildiğinde (Cox proportional hazard model backward); evre RAI 0-I,II (p=0.035,RR=0.352) (Şekil 6) kemik iliği tutulumu tipi nodüler/diffüz (p=0.019, RR=3.055) (Şekil 7), CD38 (p=0.001, RR=0.228) (Şekil 8) anlamlı olarak kalmıştır (Tablo 12).



Şekil 6. RAİ evre 0-I ve RAİ evre II ile olaysız sağ kalım arasındaki ilişki



Şekil 7. RAİ evre 0,I,II hastaların kemik iliği tutulum tipi ile olaysız sağ kalım arasındaki ilişki



**Şekil 8.** RAİ evre 0,I,II hastaların CD 38 oranı ile olaysız sağ kalım arasındaki ilişki

**Tablo 12.** Erken evre 79 KLL hastasının çok değişkenli analizi (Cox proportional hazard model backward)

Covariable	TFS		
	Exp (B) Relative risk	95% Confidence interval	Significance
Yaş <65 / ≥65	1.868	0.682-5.117	0.224
Stage (RAİ) 0 -I/II	0.352	0.133-0.928	0.035
Kemik İliği tutulumu N/D	3.055	1.198-7.790	0.019
CD 38	0.228	0.094-0.553	0.001
TCL-1	0.631	0.078-5.129	0.667

TFS: Olaysız sağ kalım

Birinci basamak tedavi alan 46 KLL hastasının tedavi sonrası olaysız sağ kalımı 82.4 ay olarak belirlendi. Hastaların 15 tanesi alkilleyici, 31 tanesi fludarabin bazlı tedavi almıştı. Hastaların 28 tanesi RAİ evre 0-II, 14 tanesi RAİ evre III-IV olarak tespit edildi. Birinci basamak tedavi alan hasta grubunda olaysız sağ kalım ile cinsiyet, yaş, RAİ evresi (0-2/3,4), kemik iliği tutulum tipi, kemik iliği lenfosit yüzdesi arasında anlamlı ilişki saptanmadı. Aynı zamanda laboratuvar değerlerinden ( $\beta$ 2M, LDH, albumin), akım sitometrik belirteçler (CD 38, ZAP70, FMC7), sitogenetik özellikler ve TCL-1, BCL-2, BAX ekspresyonları ile aralarında anlamlı ilişki gösterilemedi.

Buna karşın sadece CRP tedavi sonrası olaysız sağ kalım arasında anlamlı ilişki saptandı ( $p=0.013$ ) (Tablo 13).

**Tablo 13.** First line (F/Alk) tedavi alan KLL hastalarında TCL-1, BCL-2 ve BAX pozitifliği ile klinik ve laboratuvar parametrelerinin olaysız sağ kalım üzerine etkisi (Tek değişkenli analiz/ Logrank test)

		n	Median OS mo (10 yr %)	Log Rank p-value
Tüm Hastalar		46	82.4	
Cinsiyet	Kadın / Erkek	23/23	60.9/89.3	0.514
Yaş	<65 / ≥65	30/16	82.4/89.3	0.917
Stage (RAI)	0-2	28	(70)	
	3,4	14	63.6	0.053
Kemik tutulumu	İliği Diffüz / nodüler	26/20	89.3/60.8	0.433
Kemik lenfosit %	İliği >40/<40	43/3	59.3/(100)	0.075
β2-mikrogloblin	>3.5/<3.5	37/9	63.6/82.4	0.749
LDH (IU/L)	<480 / ≥480	31/15	82.4/63.6	0.528
C-reactive protein (mg/L)	>5/<5	17/29	59.3/89.3	0.013
Albumin	>3.5/<3.5	9/37	82.4/63.6	0.749
CD 38	>20/<20	18/19	60.9/89.3	0.532
ZAP70	>5/<5	5/33	60.8/89.3	0.203
FMC7	>20/<20	20/20	89.3/63.6	0.987
17p 13.1 p53		1/45	(100)/63.6	0.678
11q 22.3 ATM		4/42	35.6/82.4	0.457
13q14.3		7/39	46.3/82.4	0.617
Cep12(D12Z3)		3/43	60.9/82.4	0.926
TCL-1		32/14	82.4/63.6	0.261
BCL-2		27/19	63.6/89.3	0.453
BAX		28/18	89.3/63.6	0.641
Tedavi	Alkilleyici/F baze	15/31	121.8/63.6	0.378

\* Median (yıl), OS: Olaysız sağkalım, LDH, Laktik dehidrogenaz

Hastalara ait kemik iliği örneklerinden hiçbirinde MCL-1 pozitifliği saptanmadı. Sadece 3 hastada 17p delesyonu olması ve 3 hastanın kemik iliği örneğinde pozitif boyanma mevcuttu. Kontrol grubuna ait kemik iliği örneklerinde TCL-1, MCL-1, BCL-2, BAX,P53 pozitifliği görülmedi. Bu nedenden dolayı bu gruplar istatistiksel değerlendirmeye tabi tutulmadı.



## 5. TARTIŞMA

Kronik lenfositik lösemi patofizyolojisinde artmış proliferasyondan çok defektif apoptozun varlığı ve öneminden bahsedilmektedir. Bu tespitler KLL de çalışmaları apoptoz ve tedavileri de apoptoz temelli tedavilere yönlendirmiştir. KLL'doğal klinik seyri, eşlik eden genetik ve biyolojik farklılıklar nedeniyle değişkendir. Bu nedenle, bireysel risk değerlendirmesinde moleküler ve biyolojik prognostik belirteçler önem taşımaktadır.

Bu çalışmada amacımız KLL hastalarında tanı ve takipte önemi olan prognostik belirteçleri araştırmak ve klinik bulgularla korelasyonun olup olmadığını belirlemektir. Bu nedenle KLL hastalarının kemik iliği örneklerinde Mcl-1, TCL-1, Bax, Bcl-2, p53, CD20 ve CD52 ekspresyonlarını araştırdık.

Çalışmamızda hastaların %85'inin ECOG I-II olması çoğu hastanın asemptomatik ve yapılan rutin tetkiklerle başvurduğunu ve tanı aldığını göstermektedir. Hastaların 21 tanesinin evre 3-4 olmasına rağmen toplamda 46 hastanın tedavi almış olması hastaların bir kısmının takipleri süresince tedaviye ihtiyaç duyduğunu veya evre dışı tedavi endikasyonlarının geliştiğini göstermektedir. 100 hastanın %41'inde FISH yöntemi ile sitogenetik anomali tespit edilmiştir. 13q14.3 delesyonu 25(%25) hastada saptanmıştır. Literatürdede en sık görülen kromozom anomalisi 13q14.3(19) tür. Sonuçlar literatür ile uyumludur.

KLL ileri yaş grubunda daha sık görülmesine karşın daha genç hastalarda daha kötü seyretmektedir (105). Nitekim çalışmamızda, 65 yaş altı hastalarda 15 yıllık olaysız sağ kalım 124.3 ay, 65 yaş üstü hastalarda 15 yıllık olaysız sağ kalım 184.4 ay saptandı. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0.036$ ).

RAİ evre 0 olan 28 hastanın olaysız sağ kalımı %71, evre I olan 14 hastanın olaysız sağ kalımı 184.4 ay, evre II olan 37 hastanın olaysız sağ kalımı 81.1 ay olarak saptandı ( $p=0.010$ ). Hastalar RAİ evre 0-I ve RAİ evre II olarak gruplandırıldığında ise RAİ evre 0-I olan 42 hastanın 15 yıllık olaysız sağ kalımı 184,4 ay, RAİ evre II olan 37 hastanın 15 yıllık olaysız sağ kalım 81,1 ay olarak saptandı ( $p=0.003$ ).

Evre ile olaysız sağ kalım arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Bu bulgular literatürdeki diğer çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (106).

Kemik iliği tutulum tipi diffüz olan 34 hastanın 15 yıllık olaysız sağ kalımı 79.2 ay, nodüler olan 45 hastanın 15 yıllık olaysız sağ kalımı 184.4 ay olarak saptandı ( $p=0.027$ ). Bulunan sonuç istatistiksel olarak anlamlıydı. Kemik iliği tutulum tipinin prognoza olumsuz etkisi olduğunu belirten çalışmalar ile bulgularımız ile uyumludur (107,108).

CD38 ekspresyonu  $>20$  olan 15 hastanın 15 yıllık olaysız sağ kalımı 49.3 ay, CD38 değeri  $<20$  olan 42 hastanın olaysız sağ kalımı %60 olarak saptandı ( $p=0.000$ ). CD38 ekspresyonu KLL hastalarında kötü prognostik belirteçlerdendir. Rassenti ve ark (109) 705 hastada yaptıkları çalışmada CD38 (+) 333 hastada tedaviye kadar geçen süreyi 4 yıl CD38 (-) 374 hastada 5,7 yıl olarak saptamıştır ( $p<0.001$ ). Sonuçlarla uyumlu literatürde birçok çalışma mevcuttur (110).

TCL-1'in B hücre tümörlerinin gelişiminde önemli bir etkisinin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bichi ve ark (98) B ve T hücrelerinin differasyonunda belirli evrelerde görev alan TCL-1 proteinini ekspresse eden transgenik farelerin agresif B KLL gelişimine sebep olduğunu deneysel çalışmalarda göstermişlerdir. Efenov ve ark. (111) yapmış oldukları çalışmada ise B hücrelerine spesifik promoterler farelere verildikten 16-20 ay sonra bu farelerde B hücreli KLL benzeri hastalık tablosu oluşmuştur. Aggarwall ve ark (112) yapmış olduğu 9 Burkitt lenfoma, 36 Diffüz Büyük B hücreli lenfoma, 38 mantle hücreli lenfoma, 38 KLL, 33 folliküler lenfoma, 6 nodal marginal zon lenfoma, 27 splenik marginal zon lenfomayı içeren toplam 187 vakalı B hücre tümörlerinde TCL-1 ekspresyonu ve klinik değişkenlik çalışmasında tüm vakalarda TCL-1 ekspresyonu görülmüş mevcut çalışmalar B hücre tümörlerinde TCL-1 in önemli bir fonksiyona sahip olduğunu kanıtlamıştır.

B hücre tümörlerinin gelişim mekanizmasında önemli bir yeri olan TCL-1 proteinin bu etkiyi hangi mekanizmalar yoluyla ortaya çıkardığı ise henüz net olarak aydınlatılmamıştır. Pekarsky ve ark (97) TCL-1 in T hücrelerinde kritik antiapoptotik molekül olan Akt onkoproteininin kofaktörü olduğunu göstermişlerdir. Malstrom ve ark (113) ise transgenik farelerin timosit kültürlerinde yaptıkları deneysel çalışmalarla T hücrelerinde sürekli olarak Akt ekspresse edilmesiyle T hücre lösemilerinin geliştiğini yayımlamışlardır.

Ancak Suzuki ve ark'nın (114) fare B hücrelerinde yaptıkları çalışmada tümör baskılayıcı gen olan Pten'in delesyonu ile Akt'nin kuvvetli şekilde aktive edildiğini saptamaları fakat bu farelerde B hücre malignitelerinin gelişmemesi TCL-1'in Akt aktivasyonu dışında farklı bir yolak ile B CLL'ye neden olabileceğini düşündürmesine sebep olmuştur. TCL-1'in farklı bir yolak ile B hücre tümörlerine yol açtığının düşünülmesi ilgili olarak Pekarsky ve ark (100) transgenik fare modellerinde yapmış oldukları çalışmada B KLL'de NFκB yolağının önemli olduğuna vurgu yapmışlardır. Planalles ve ark (115) transgenik fare modellerinde yapmış olduğu çalışmada NFκB aktivasyonunda yer alan TNF ailesinin bir üyesi olan proliferasyon-indükleyici TNF ligandının (APRIL) transgenik ekspresyonun CD5(+) B hücrelerinde anlamlı artışa neden olması NFκB yolağının TCL-1'in etkisinde önemli bir yere sahip olduğunu destekler niteliktedir. Pekarsky ve ark (116) ise transgenik fare modellerine ait çalışmalardan sonra 600 KLL örneğinin mRNA sında yapmış oldukları insan çalışmasında ise TCL-1'in NFκB bağımlı transkripsiyonu indüklediğini ve transkripsiyonel komplekslerde direkt yer alarak aktive protein 1 (AP-1) bağımlı transkripsiyonu baskıladığını rapor etmişlerdir. Çoğu B KLL hücresinin proliferasyon olmaması (117,118) bu hücrelerde TCL-1' in AP-1 aracılı apoptozun inhibisyonu ve NFκB yolağının aktivasyonu ile hücre sağ kalımının arttığına işaret etmektedir şeklinde yorumlanmıştır (116). Ancak Efenov ve ark (111) yapmış oldukları B hücrelerine spesifik promotörler farelere verildikten 16-20 ay sonra bu farelerde B hücreli KLL benzeri hastalık tablosu oluşturduğu çalışmada ise dalak ve lenf nodlarında yapılan immünofenotiplemede elde edilen CD5 ve CD23 (+) hücrelerde Akt fosforilasyon seviyelerinin anlamlı miktarda arttığı gözlemlenmiş ve aynı çalışmada deneysel farelerde insanlardaki KLL ye benzeyen hipolimfositik lenfositik lenfoma, anormal sitokin seviyeleri ve bozulmuş immün cevap tablosu gösterilmiştir. Bu bulgular insanlardaki B hücreli KLL ve farelerdeki TCL1 ile ilişkili B hücreli KLL arasında biyokimyasal ve immünolojik benzerlikler ortaya koymuştur.

Herling ve ark (119) 213 KLL vakasında yapmış oldukları çalışmada vakaların %90'ında TCL-1 ekspresyonunun olduğunu, ancak bu ekspresyon miktarının ise farklı miktarlarda olduğunu raporlandırmışlardır. Aggarwall ve ark (112) ise 187 vakalı B hücre tümörlerinde TCL-1 ekspresyonunu inceleyen çalışmada TCL-1'in en yüksek olarak burkitt lenfoma olgularında ekspresyon olduğunu rapor etmişlerdir (112).

Literatürde farklı yöntemlerle KLL de ve diğer B hücre tümörlerinde TCL-1 ekspresyonu ile klinik parametreler arasındaki ilişkiyi belirlemek amaçlı çeşitli çalışmalar yayımlanmıştır. Ramuz ve ark (120) 31 Diffüz Büyük B hücreli lenfoma ve 21 folliküler lenfoma hastasının biyopsi örneklerinde (DNA- microarrays) TCL-1 mRNA ekspresyonu ile Diffüz Büyük B hücreli lenfoma hastalarında nüks arasında ilişkili bulmuştur. Aggarwall ve ark (112) 187 vakalı çalışmada TCL-1 ekspresyonunun en fazla ekspresyonun en fazla agresif lenfoma formu olan burkitt lenfomada olduğu görülmüştür. Aynı çalışmanın klinik korelasyon sonucunda mantle hücreli lenfomada daha kısa sağ kalım görülmüştür. Pekarsky ve ark (121) 23 indolent, 25 agresif, 32 11q delesyonu içeren agresif KLL özellikleri içeren hasta grubunda yaptıkları çalışmada agresif KLL formlarının aşırı düzeyde TCL-1 ekspresyonu ettiğini göstermişlerdir. Bu sonuçlar agresif KLL formunun gelişiminde TCL-1' in özellikle önemli olduğuna işaret etmektedir.

Herling ve ark (122) 2009 yılında yayımlanan 70 hastada BCR uyarılmasına invitro yanıt ve TCL-1 düzeyleri ile olan ilişkisi çalışmasında yüksek TCL-1 düzeyleri kısa progresyonsuz sağ kalım ile ilişkili (tahmini  $p < 0.001$ ) olduğu tespit edilmiştir. Aggarwall ve ark. (112) yapmış olduğu 187 vakalı çalışmada ise KLL de TCL-1'in aşırı ekspresyonu olan vakaların daha kısa sürede tedavi ihtiyacı olduğunu ve TCL-1'in aşırı ekspresyonun prognostik önemi gösterilmiştir. Mahmoud ve ark (123) PCR yöntemi kullanılarak 96 erkek 48'i kadın 144 KLL hastasının doku örneklerinden TCL-1 mRNA düzeyleri ölçümünde (100 periferik kan, 21 kemik iliği, 16 lenf nodu, 7 dalak dokusuna ait örnek) yüksek TCL-1 mRNA ekspresyonları olan vakaların ortalama sağkalımını 7 yıl, düşük TCL-1 mRNA ekspresyonları olan vakaların ortalama sağkalımını 12,2 yıl olarak yayınlamışlardır. Bizim çalışmamızda ise 100 KLL hastasının kemik iliği biyopsilerini immünohistokimyasal yöntemle yapılan değerlendirmesinde 70(%70) hastada TCL-1 pozitifliği saptanmış, TCL-1 ekspresyonu pozitif olan 62 erken evre KLL hastasının 15 yıllık olaysız sağ kalımı 124.3 ay, TCL-1 negatif olan 17 hastanın 15 yıllık olaysız sağ kalımı %74 olarak saptanmıştır ( $p=0.0043$ ). Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup literatür ile uyumludur. Bu çalışmalar, çalışmamızda bulunan TCL-1 pozitif KLL olgularındaki olaysız sağ kalımın TCL-1 negatif olanlara göre kısa olduğunu desteklemektedir.

Herling ve ark'nın (122) 2009 yılında yayımlanan 70 hastada BCR uyarılmasına invitro yanıt ve TCL-1 düzeyleri ile olan ilişkisi çalışmasının sub grup analizlerinde yüksek TCL-1 düzeyleri ileri klinik evre, agresif hastalık, yüksek lökosit sayısı, kısa lenfosit katlanma süresi gibi agresif hastalık özellikleri ile ilişkili bulunmuştur. KLL deki kötü prognostik faktörlerden olan bu değişkenler TCL-1 ekspresyonu arasında bizim çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır. Bu sonuç vaka sayımızın azlığı ile ilişkili olabilir.

Herling ve ark (119) 213 KLL vakasında yapmış oldukları çalışmada TCL-1 ekspresyonu ile ZAP70 ekspresyonu ( $p=0.007$ ), U-KLL ( $p=0.005$ ), 11q22–23 delesyonu ( $p=0.04$ ) ile ilişkili olarak bulmuşlardır. Ancak Rebekah ve ark (124) progresif KLL si olan tedavi edilmemiş 64 hastanın değerlendirilebilen 51' inde hastalarda tedavi öncesi periferik kan mononükleer hücre örneklerinde TCL-1 düzeyini ölçerek yapmış oldukları çalışmada önceden belirlenen risk faktörleri ile TCL-1 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulamamışlardır ve tedavi öncesi risk faktörleri olarak; 70 üzerinde yaşı ( $p=0.59$ ), cinsiyeti ( $p=0.67$ ), del (17p) veya del (11q) interfaz sitogenetik anormalliklerinin meydana gelişini ( $p=0.15$ ), IgVH mutasyon durumunu ( $p= 0.94$ ), hücrelerin %20'den fazlasında ZAP-70 ekspresyonunu ( $p=0.51$ ) veya %30'un üzerinde CD38 ekspresyonunu değerlendirmişlerdir ( $p=0.40$ ). Bizim çalışmamızda da TCL-1 ekspresyonu ile hastaların akım sitometri belirteçlerinden CD38 ( $> \%20$  ve  $< \%20$ ), ZAP 70 ( $> \% 5$  ve  $< \%5$ ), FMC7 düzeyi ( $> \%20$  ve  $< \%20$ ) ayrıca sitogenetik özellikler, evre (RAİ), yaş, cinsiyet ve laboratuvar bulguları ile anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Rebekah ve ark (124) progresif KLL'si olan tedavi edilmemiş 64 hastanın değerlendirilebilen 51 hastada yapmış oldukları çalışmada 6 aylık tedavi döngüsü sonrasında aynı hasta grubunda tedavi sonrası periferik kan mononükleer hücre örneklerinde TCL-1 düzeyini ölçmüş TCL-1 düzeyleri ile tedavi sonuçları arasında anlamlı ilişki göstermiştir. Azalmış TCL-1 ekspresyonu gösteren hastaların NCI kriterlerine göre tam yanıt ulaşmasının daha olası olduğu öne sürülmüştür (%49'a karşı %19;  $p=0.064$ ). Medyan PFS TCL-1'i  $<0.275$  olanlara karşı artmış TCL-1 ekspresyonu gösteren hastalarda daha kısa gibi görünmüştür (20.3 aya karşı 32.6 ay;  $p = 0.199$ ). Bu farklar istatistiksel anlamlılığa ulaşmamış olmasına karşın, eğrilerde ve karşılık gelen medyanlarda gözlenen farklar bu yeni belirtecin daha iyi istatistiksel güce sahip daha büyük çalışmalarda araştırılmasını desteklemektedir şeklinde yorumlanmıştır.

Mevcut sonuçlar TCL-1 pozitifliğinin KLL de kötü bir belirteç olduğunu desteklemekte ve çalışmamızda bulunan TCL-1 pozitif hastalardaki kısa olaysız sağ kalım süresini ve tedaviye ihtiyacın daha kısa sürede oluştuğunu gösteren çalışma sonuçlarını destekler niteliktedir.

Mahmoud ve ark (123) PCR yöntemi kullanılarak 96 erkek 48'i kadın 144 KLL hastasının doku örneklerinden TCL-1 mRNA düzeyleri ölçümünde TCL-1 mRNA düzeyi IGVH 3-21 mutasyonu görülmeyen 21 hastada anlamlı derecede yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Herling ve arkadaşları (119) 213 KLL vakasında yapmış oldukları çalışmada yüksek TCL-1 ekspresyonunu U-KLL (p=0.005) ile ilişkili olarak bulmuşlardır. Herling ve ark da (122) 70 hastada BCR uyarılmasına invitro yanıt ve TCL-1 düzeyleri ile olan ilişkisi çalışmasının sub grup analizlerinde U-KLL olgularında TCL-1 düzeyi yüksek bulmuştur. KLL de kötü prognostik özelliklerden U-KLL de TCL-1 ekspresyonun yüksek bulunması ile ilgili bu korelasyon TCL-1'in olumsuz bir prognoz belirleyici olarak kullanılma durumunu desteklemektedir.

Mahmoud ve ark (119) 144, Pekarsky ve ark (121) 70, Herling ve ark (122,123) 213 ve 70 vakalı ayrı iki çalışmada, TCL-1 ekspresyonları ile 11q delesyonu olan hasta gruplarında TCL-1 ekspresyonunu yüksek olduğunu yayımlamışlardır. Bizim çalışmamızda ise TCL-1 ekspresyonu ile 11q delesyonu ile aralarında anlamlı ilişki bulunamamıştır. Çalışmamızda 100 hastadan sadece 7 tanesinde görülen 11q delesyonu ile anlamlı korelasyon kurulamaması 11 q delesyonu olan vaka sayısının azlığından kaynaklandığı düşündürmüştür.

BCR sinyal mekanizmasında protein kinaz C ailesinin 10 farklı izoenziminden biri olan ve KLL patogeneğinde direk etkili olan protein kinaz C beta KLL de kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (125,126). Herling ve ark (122) 2009 yılında yayımlanan çalışmada BCR düzeyi ile TCL-1 arasında ilişki tespit edilmiş ve BCR ilişkili kinazların tedavide yardımcı olabileceğine dair görüş belirtilmiştir. Holler ve ark yapmış oldukları çalışmada ise (127) TCL-1'in etkisinde rolü olduğu düşünülen Akt ve ayrıca protein kinaz c betanın sinerjistik inhibitörü olan enzastaurin'nin 19 KLL örneğinde apoptozu indüklediği görülmüş ve yeni teraopatik ajanlar için umut vaat etmiştir.

Çalışmamızdaki RAİ evresi ile BCL-2 ve BAX ekspresyonu ilişkisi saptanmamıştır. Saxena ve ark (128) 51 KLL hastasının periferik kan lenfositlerinde western blot analizi ile yapılan çalışmada BCL-2 ve BAX ekspresyonları ile RAİ evresi arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Benzer bulgular Binet JL ve ark (129), Kitada S ve ark (130), Robertson Le ve ark (131), Gottardi ve ark (132) tarafından yapılan çalışmalarda da BCL-2 ve BAX ekspresyonları ile RAİ evresi arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Saxena ve ark (128) 51 KLL hastasının periferik kan lenfositlerinde western blot analizi ile yapılan çalışmasının multivarite analizlerinde BCL-2 ve BAX ekspresyonları ile tedaviye kadar geçen süre arasında ilişki saptanmamıştır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak TCL-1 KLL hastalarında prognostik bir belirteç olarak kabul edilebilir. Hastalığın progresyonu ve takibinde yol gösterici olabilir. TCL-1 yolağı inhibisyonu ve BCR ilişkili yolaklarda inhibisyon yapan ilaç ve mekanizmalar KLL'de hastalığın klinik gidişini değiştirebilir. Bunun için geniş serili vaka kontrollü çalışmaların yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

MCL-1 pozitifliği hiçbir KLL ve kontrol biyopsi grubu örneklerinde görülmediği için istatistiki değerlendirme dışında bırakılmıştır. Projemizde p53 ekspresyonu ile ilgili değerlendirme sadece 3 hastada 17p delesyonu olması ve 3 hastanın kemik iliği örneğinde pozitif boyanma olması nedeni ile p53 istatistiki değerlendirmeye alınmamıştır. CD20/CD52 oranı yer almasına rağmen teknik nedenlerden CD52 çalışılmamıştır. CD52 çalışılmaması nedeni ile CD 20 de değerlendirme kapsamı dışında tutulmuştur.



## 7. KAYNAKLAR

1. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol.* 1997;108(4):378-82.
2. Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, Botteman MF, Pashos CL. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care.* 2004;3(3):279-87.
3. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. In: *American Society of Hematology 50th Anniversary Reviews.* Washington: 2008;213–223.
4. Caligaris-Cappio F. B- chronic lymphocytic leukemia: A malignancy of anti- self B cells. *Blood.* 1996;87:2615–2620.
5. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest.* 2005;115:755-764.
6. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 2008;371:1017-1029.
7. Cordone I, Masi S, Mauro FR, Soddu S, Morsilli O, Valentini T et al. p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood.* 1998;91:4342-4349.

8. Johnston JB, Daeninek P, Verburg L, Lee K, Williams G, Israels LG et al. p53, mdm-2, bax and bcl-2 induce drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1997;26:435-449.
9. Pleyer L, Egle A, Hartmann TN, Greil R. Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6:405-418.
10. Plass C, Byrd JC, Raval A, Tanner SM, De la Chapelle A. Molecular profiling of chronic lymphocytic leukaemia: genetics meets epigenetics to identify predisposing genes. *Br J Haematol*. 2007;139:744-752.
11. Chen J, McMillan NAJ. Molecular basis of pathogenesis, prognosis and therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Can Biol Ther*. 2008;7(2):174-179.
12. Ferrajoli A, Keating MJ, Manshuri T, Koller CA, Kurzrock R, Thomas DA et al. The clinical significance of tumor necrosis factor- $\alpha$  plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100:1215-1219.
13. Kilada S, Zapala IM, Andreeff M, Reed JC. Bryostatin and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1999;106:995-1004.
14. Kipps TJ, Carson DA. Autoantibodies in chronic lymphocytic leukemia and related systemic autoimmune diseases. *Blood*. 1993;81:2475-2487.
15. Di Raimondo F, Albilar M, Huh Y, O'Brien S, Montillo M, Tedeschi A et al. The clinical and diagnostic relevance of CD23 expression in the chronic lymphoproliferative disease. *Cancer*. 2002;94:1721-1730.
16. Cheson BD, Bennett JM, Grever M. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*. 1996;87:4990-7.

17. Binet JL, Caligaris-Cappio F, Catovsky D, Cheson B, Davis T, Dighiero G, et al. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL). Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006;107:859-61.
18. Johnston JB. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Wintrobe's Clinical Hematology*. In : Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Pareskevas F, eds. 11th ed. Philadelphia: LWW;2004.p.2429-63.
19. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343:1910-1916.
20. Aalto Y, El-Rifa W, Vilpo L, Ollila J, Nagy B, Vihinen M, et al. Distinct gene expression profiling in chronic lymphocytic leukemia with 11q23 deletion. *Leukemia*. 2001;15:1721-1728.
21. Kalil N, Cheson BD. Chronic Lymphocytic Leukemia. *The Oncologist*. 1999;4:352–369.
22. Hallek M. New Concepts in The Pathogenesis, Diagnosis, Prognostic Factors and Clinical Presentation of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Rev Clin Exp Hematologia*. 2000;4:103-117.
23. Venugopal P, Gregory SA. Lymphoproliferative disorders. In: Kahn MJ, Gregory SA, editors. *American Society of Hematology Self-Assessment Program*. 3rd edition. Washington: 2007;265–297.
24. Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, Cordone I, Crescenzi S, Pescarmona E, et al. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood*. 1999;94:448-454.

25. Catovsky D, Fooks J, Richards S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. *Br J Haematol.* 1989;72:141-149.
26. Oscier DG, Matutes E, Copplestone A. Atypical lymphocyte morphology: an adverse prognostic factor for disease progression in stage A CLL independent of trisomy 12. *Br J Haematol.* 1997;98:934-939.
27. Matutes E, Polliack A. Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol.* 2000;4:22-47.
28. Montserrat E, Sanchez-Bisonô J, Vinolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. Analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol.* 1986;62:567-575.
29. Frisch B, Bartl R. Histologic classification and staging of chronic lymphocytic leukemia. A retrospective and prospective study of 503 cases. *Acta Haematol.* 1988;79:140-152.
30. Oudat R, Keating MJ, Lerner S. Significance of the levels of bone marrow lymphoid infiltrate in chronic lymphocytic leukemia patients with nodular partial remission. *Leukemia.* 2002;16:632-635.
31. Geisler CH, Hou-Jensen K, Jensen OM, Tinggaard-Pedersen N, Hansen MM, Hansen NE et al. The bone marrow infiltration pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia is not an important prognostic factor. Danish CLL Study Group. *Eur J Haematology.* 1996; 57:292-300.
32. Oscier D, Fitchett M, Herbert K. Karyotypic evolution in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 1991;3:16-20.

- 33.Gribben JG. Molecular profiling in CLL. In: Gewirtz AM, Muchmore EA, Burns LJ, editors. American Society of Hematology Education Book. Washington: 2008;444-449.
- 34.Hamblin TJ. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007;20(3):455-468.
- 35.Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic Lymphocytic leukaemia *Lancet.* 2004;363(9403)105-111.
- 36.Fegan C, Robinson H, Thompson P, Whittaker JA, White D. Karyotypic evolution in CLL. Identification of a new sub-group of patients with deletions of 11q and advanced or progressive disease. *Leukemia.* 1995;9:2003-2008.
- 37.Finn WC, Kay NE, Kroft SH, Church S, Peterson LC.. Secondary abnormalities of chromosome 6q in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a sequential study of karyotypic instability in 51 patients. *Am J Hematol.* 1998;59:223-229.
- 38.Ghia P. IGHV gene mutational status and prognosis in chronic lymphocytic leukemia: its relationship to other prognostic markers. In: Ghia P, Rosenquist R, Davi F, editors. *Immunoglobulin Gene Analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia.* Milan: Wolters Kluwer, 2009;81–94.
- 39.Montserrat E. New prognostic markers in CLL. In: Berliner N, Linker C, Schiffer CA, editors. American Society of Hematology Education Book. Washington: 2006;279–284.
- 40.Van Bockstaele F, Verhasselt B, Philippe J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev.* 2009; 23(1):25-47.
- 41.Keating MJ, O'Brien S. Conventional Management of chronic lymphocytic leukemia. *Rew Clin Exp Hematolgy.* 2000;42:118-133.

- 42.Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343:1750-1757.
- 43.CLL Trialists Collaborative Group. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta analysis of the randomized trials. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:861-868.
- 44.Keating MJ, O'Brien S, Albitar M. Emerging information on the use of rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol.* 2002;29(1 Suppl 2):70-4.
- 45.Pott-Hoeck J, Hiddeman W. Purine analogs in the treatment of low grade lymphomas and chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol.* 1995; 6:421-433.
- 46.Apperley JF, Gluckman E, Gratwohl A. Blood and marrow transplantation. *The EBMT Hand book.* Eds. Revised Edition 2009.
- 47.Sreedhar A, Csermely S. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy. A comprehensive review. *Pharma Therape.* 2004;101:227-257.
- 48.Samali A, Orrenius S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chap.* 1998;3:228-236.
- 49.Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci.* 2003;15:4077-85.
- 50.Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15(6):725-31.

- 51.Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* 1999;274(17):11549-56.
- 52.Meijerink JP, Mensink EJ, Wang K. Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood.* 1998;91:2991-2997.
- 53.Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell.* 2010;37(3):299-310.
- 54.Reed JC. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood.* 2008;111(7):3322-30.
- 55.Dewson G, Kratina T, Sim HW, Puthalakath H, Adams JM, Colman PM, et al. To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3:groove interactions. *Mol Cell.* 2008;30(3):369-80.
- 56.Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van Dyke T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature.* 1997;385(6617):637-40.
- 57.Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family:roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 2003;22:8590-8607.
- 58.Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of BCL-2 and BAX in gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene.*1994;9:1799-1805.
- 59.Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science.* 1997;275:967-969.

- 60.Meijerink JP, Mensink EJ, Wang K, Sedlak TW, Slöetjes AW, de Witte T et al. Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood*. 1998;91:2991-2997.
- 61.Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*. 1993;75(2):229-40.
- 62.Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*. 1993;75:229-240.
- 63.Knudson CM, Tung KSK, Tourtellotte WG, Brown GAJ, Korsmeyer SJ. Baxdeficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*. 1995;270:96-99.
- 64.Opferman JT, Iwasaki H, Ong CC, Suh H, Mizuno S, Akashi K, et al. Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science*. 2005;307:1101-1104.
- 65.Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC, Korsmeyer SJ. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature*. 2003;426:671-676.
- 66.Ranger AM, Zha J, Harada H, Datta SR, Danial NN, Gilmore AP et al. Bad-deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100:9324-9329.
- 67.Hamasaki A, Sendo F, Nakayama K, Ishida N, Negishi I, Hatakeyama S. Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene. *J Exp Med*. 1998;188:1985-1992.



68. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP et al. Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B-cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*. 1989;57:79-88.
69. Yunis JJ, Mayer MG, Arensen MA, Aeppli DP, Oken MM, Frizzera G. Bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 1989;320:1047-1054.
70. Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay MF, Briere J, Lavignac C et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1996;87:265-272.
71. Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood*. 1993;81:151-157.
72. Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res*. 1992;52:5407-5411.
73. Campos L, Sabido O, Rouault J-P, Guyotat D. Effects of Bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides on in vitro proliferation and survival of normal marrow progenitors and leukemic cells. *Blood*. 1994;84:595-600.
74. Colombel M, Symmans F, Gil S, O'Toole KM, Chopin D, Benson M, et al. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *Am J Pathol*. 1993;143(2):390-400.
75. Webb A, Cunningham D, Cotter F, Clarke PA, di Stefano F, Ross P, et al. BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*. 1997;349:1137-1141

- 76.Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed J. Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1993;82:1820-1828.
- 77.Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Nat Acad Sci*. 2005;102:13944-13949.
- 78.Yang-Yen HF. Mcl-1: a highly regulated cell death and survival controller. *J Biomed Sci*. 2006;13(2):201-4.
- 79.Ma Y, Cress WD, Haura EB.Flavopiridol-induced apoptosis is mediated through up-regulation of E2F1 and repression of Mcl-1. *Mol Cancer Ther*. 2003;2(1):73-81.
- 80.Moshynska O , Koravangattu Sankaran, Punam Pahwa, Anurag Saxena Prognostic Significance of a Short Sequence Insertion in the MCL-1 Promoter in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Nat Cancer Inst*. 2004;96:673-82.
- 81.Pepper C, Lin TT, Pratt G, Hewamana S, Brennan P, Hiller L, et al. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood*. 2008;112:3807–3817.
- 82.Veronese L, Tournilhac O, Verrelle P, Davi F, Dighiero G, Chautard E, et al. Low MCL-1 mRNA expression correlates with prolonged survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2008;22:1291–1293.
- 83.Chen R, Keating MJ, Gandhi V, Plunkett W. Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood*. 2005;106:2513–2519.

84. Lucas DM, Edwards RB, De Lay MD, The plant-derived agent silvestrol has B-cell selective activity in vitro in chronic lymphocytic leukemia patient cells and in vivo in the Tcl-1 mouse model of CLL. *Blood*. 2007;110:3123-3127.
85. Oltvai ZN, Milliam CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;34:344-367.
86. Zhang L, Yu J, Park BH, Kinzler KW, Vogelstein B. Role of Bax in the apoptotic response to anticancer agents. *Science*. 2000;290:989-992.
87. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*. 1997;275(5302):967-9.
88. Peng H, Aiello A, Packham G, Isaacson PG, Pan L. Infrequent bax gene mutations in B-Cell Lymphomas. *J Pathol*. 1998;186: 378-82.
89. Saxena A, Moshynska O, Sankaran K, Viswanathan S, Sheridan DP. I: Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5-UTR of Bax gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer Lett*. 2002;187:199-205.
90. Starczynski J, Pepper C, Pratt G, Hooper L, Thomas A, Milligan D, et al. Common Polymorphism G(-248)A in the Promoter Region of the bax Gene Results in Significantly Shorter Survival in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia Once Treatment Is Initiated. *J Clin Oncol*. 2005;23:1514-1521.
91. Ribeiro-Silva A, Ramalho LN, Garcia SB, Zucoloto S. The relation between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. *Arch Pathol Lab Med*. 2003;127:336-340.

- 92.Lianes P, Orlow I, Zhang ZF, Oliva MR, Sarkis AS, Reuter V, et al. Altered patterns of MDM-2 and TP53 expression in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86:1325-1330.
- 93.Spitz FR, Giacco GG, Hess K, Larry L, Rich TA, Janjan N, et al. P53 immunohistochemical staining predicts residual disease after chemoradiation in patients with high-risk rectal cancer. *Clin Cancer Res.* 1997;3:1665-1690.
- 94.Silber R, Degar B, Costin D, Newcomb EW, Mani M, Rosenberg CR, et al. Chemosensitivity of lymphocytes from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia to chlorambucil, fludarabine, and camptothecin analogs. *Blood.* 1994;84(10):3440-6.
- 95.Zenz T, Häbe S, Denzel T, Winkler D, Hallek M, Hensel M, et al. The activity of Alemtuzumab is independent of p53 Mutational status in fludarabine refractory CLL: Final analysis from the CLL2H study of the GCLLSG. *Ann Oncol.* 2008;43:204-6.
- 96.O'Brien S, Moore JO, Boyd TE, Larratt LM, Skotnicki A, Koziner B, et al. Randomized phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen sodium (Bcl-2 antisense) in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2007;25:1114-1120.
- 97.Virgilio L, Narducci MG, Isobe M, Billips LG, Cooper MD, Croce CM, et al. Identification of the TCL1 gene involved in T cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91:12530–12534.
- 98.Pekarsky Y, Koval A, Hallas C, Bichi R, Tresini M, Malstrom S, et al. Tc11 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97:3028–3033.

99. Bichi R, Shinton SA, Martin ES, Koval A, Calin GA, Cesari R, et al. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99:6955–6960.
100. Malstrom S, Tili E, Kappes D, Ceci JD, Tschlis PN. Tumor induction by an Lck-MyrAkt transgene is delayed by mechanisms controlling the size of the thymus. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98:14967–14972.
101. Pekarsky Y, Zanesi N, Aqeilan RI, Croce CM. Animal models for chronic lymphocytic leukemia. *J Cell Biochem.* 2007;100:1109–1118.
102. Zhou P, Qian L, Bieszczad CK, Noelle R, Binder M, Levy NB, Craig RW. Mcl-1 in transgenic mice promotes survival in a spectrum of hematopoietic cell types and immortalization in the myeloid lineage. *Blood.* 1998;92:3226-3239.
103. Manshoury T, Do KA, Wang X, Giles FJ, O'Brien SM, et al. Circulating CD20 is detectable in the plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and is of prognostic significance. *Blood.* 2003;101(7):2507-2513.
104. M Q Xia, G Hale, M R Lively, M A Ferguson, D Campbell, L Packman, et al. Structure of the CAMPATH-1 antigen, a glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein which is an exceptionally good target for complement lysis. *Biochem J.* 1993;293(3):633–640.
105. Salisbury JR, Rapson NT, Codd JD, Rogers MV, Nethersell AB: Immunohistochemical analysis of CDw52 antigen expression in non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Pathol.* 1994;47(4):313-317.
106. Shanafelt TD, Rabe KG, Kay NE, Zent CS, Jelinek DF, Reinalda MS, et al. Age at diagnosis and the utility of prognostic testing in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 2010;24:14-22.

107. Rozman C, Montserrat E, Rodríguez-Fernández JM, Ayats R, Vallespí T, Parody R, et al. Bone marrow histologic pattern--the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood*. 1984;64(3):642-8.
108. Bergmann MA, Eiscchorst BF, Busch R. Prospective evaluation of prognostic parameters in early stage chronic lymphocytic leukemia (CLL). Results of the CLL1 protocol of the German CLL study group. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2007;110:625.
109. Ghia P, Guida G, Stella S, Gottardi D, Geuna M, Strola G, et al. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood*. 2003;101(4):1262-9.
110. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, Wierda WG, Grever MR, Byrd JC et al. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;112(5):1923-30.
111. Efanov A, Zanesi N, Nazaryan N, Santanam U, Palamarchuk A, Croce CM, et al. CD5+CD23+ leukemic cell populations in TCL1 transgenic mice show significantly increased proliferation and Akt phosphorylation. *Leukemia*. 2010;24(5):970-5.
112. Aggarwal M, Villuendas R, Gomez G, Rodriguez-Pinilla SM, Sanchez-Beato M, Alvarez D, et al. TCL1A expression delineates biological and clinical variability in B-cell lymphoma. *Mod Pathol*. 2009;22(2):206-15.
113. Malstrom S, Tili E, Kappes D, Ceci JD, Tschlis PN. Tumor induction by an Lck-MyrAkt transgene is delayed by mechanisms controlling the size of the thymus. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98(26):14967-72.

114. Suzuki A, Kaisho T, Ohishi M, Tsukio-Yamaguchi M, Tsubata T, Koni PA, et al. Critical roles of Pten in B cell homeostasis and immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med*. 2003;197(5):657-67.
115. Planelles L, Carvalho-Pinto CE, Hardenberg G, Smaniotto S, Savino W, Gómez-Caro R, et al. APRIL promotes B-1 cell-associated neoplasm. *Cancer Cell*. 2004;6(4):399-408.
116. Pekarsky Y, Palamarchuk A, Maximov V, Efanov A, Nazaryan N, Santanam U, et al. Tc11 functions as a transcriptional regulator and is directly involved in the pathogenesis of CLL. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(50):19643-8.
117. Cheson B, Sgambati M, Linet M, Devesa S. In *Chronic Lymphocytic Leukemias, Chronic lymphocytic leukemia, epidemiological, familial, and genetic aspects*, ed Cheson B (Dekker, New York), 2nd Ed, pp 33–62.
118. Bullrich F, Croce C. In *Chronic Lymphocytic Leukemias, Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia*, ed Cheson B (Dekker, New York), 2nd Ed, pp 9–32.
119. Herling M, Patel KA, Khalili J, Schlette E, Kobayashi R, Medeiros LJ, et al. TCL1 shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state. *Leukemia*. 2006;20(2):280-285.
120. Ramuz O, Bouabdallah R, Devilard E, Borie N, Groulet-Martinec A, Bardou VJ, et al. Identification of TCL1A as an immunohistochemical marker of adverse outcome in diffuse large B-cell lymphomas. *Int J Oncol*. 2005;26(1):151-7.
121. Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, et al. Tc11 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res*. 2006;66(24):11590-3.

- 122.Herling M, Patel KA, Weit N, Lilienthal N, Hallek M, Keating MJ, et al. High TCL1 levels are a marker of B-cell receptor pathway responsiveness and adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;114(21):4675-86.
- 123.Mansouri MR, Sevov M, Aleskog A, Jondal M, Merup M, Sundström C, et al. IGHV3-21 gene usage is associated with high TCL1 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*. 2010;84(2):109-16.
- 124.Browning RL, Geyer SM, Johnson AJ, Jelinek DF, Tschumper RC, Call TG, et al. Expression of TCL-1 as a potential prognostic factor for treatment outcome in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2007;31(12):1737-40.
- 125.Leitges M, Schmedt C, Guinamard R, Davoust J, Schaal S, Stabel S, et al. Immunodeficiency in protein kinase c beta-deficient mice. *Science*. 1996;273(5276):788-91.
- 126.Rodríguez A, Villuendas R, Yáñez L, Gómez ME, Díaz R, Pollán M, et al. Molecular heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia is dependent on BCR signaling: clinical correlation. *Leukemia*. 2007;21(9):1984-91.
- 127.Holler C, Piñón JD, Denk U, Heyder C, Hofbauer S, Greil R, et al. PKCbeta is essential for the development of chronic lymphocytic leukemia in the TCL1 transgenic mouse model: validation of PKCbeta as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;113(12):2791-4.
- 128.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;75(1):22-33.
- 129.Binet JL, Plunkett W, Robertson B, Merle-Beral, Mentz F, Hoffbrand AV, et al. What does apoptosis mean in CLL? *Leukemia Lymphoma*. 1996;22(2):47-52.



130. Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. *Blood*. 1998;91:3379–3389.

131. Robertson LE, Plunkett W, McConnell K, Keating MJ, McDonnell TJ. Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia*. 1996;10:456–459.

132. Gottardi G, Alfarano A, De Leo AM, Stacchini A, Aragno M, Rigo A, et al. In leukemic CD5+ B cells the expression of Bcl-2 gene family is shifted toward protection from apoptosis. *Br J Haematol*. 1996;94:612–618.