

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Nedim Yılmaz SELÇUK

KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİDE HÜCRE YÜZEY ANTİJENLERİNİN

(CD38-CD138-CD56-CD16) VE ZAP-70 SEVİYESİNİN EVRE VE PROGNOZA ETKİSİ

Dr. Sevilay TUNÇEZ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Aynur UĞUR BİLGİN

KONYA

2012

1. İÇİNDEKİLER

I. İÇİNDEKİLER.....	i-ii
II. KISALTMALAR	iii-iv
III. TABLOLAR.....	v
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. LENFOSİTLER.....	3
2.1.1.T Lenfositler.....	3
2.1.2.B Lenfositler.....	4
2.1.3.NK ve NKT Hücreler.....	4
2.2. KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ.....	5
2.2.1Tanı.....	5
2.2.2.Klinik.....	6
2.2.3.Klinik Evreleme.....	7
2.2.4.Prognoz.....	8
2.2.4.1.Klinik Prognostik Faktörler.....	8
2.2.4.2.Serolojik Belirteçler.....	10
2.2.4.3.Yeni Biyolojik Faktörler.....	11
2.2.4.4.Diğer Prognostik Faktörler.....	14
2.3.IgVH MUTASYONU.....	14
2.4 ZAP-70.....	15
2.5.CD38.....	17

2.6.CD138.....	19
3.GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. FLOW SİTOMETRİ ANALİZİ.....	19
3.2. ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI.....	20
3.3. HASTA SEÇİMİ.....	21
3.4. ZAP-70 İFADELENMESİ.....	22
3.5. CD38-CD138-CD56-CD16 YÜZEY MOLEKÜL İFADELENMESİ.....	22
4.İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	22
5.BULGULAR	23
6.TARTIŞMA VE SONUÇ	28
7.ÖZET	32
8.ABSTRACT	34
9.KAYNAKLAR	36

KISALTMALAR

KLL: Kronik Lenfositik Lösemi

IgVH: İmmünglobulin ağır zincir değişken bölgesi

ZAP – 70 : Zeta zinciri ilişkili protein 70

THR: T hücre reseptörü (T Cell Reseptor)

NK: Natural killer

Kİ: Kemik iliği

LGL : Large Granüler Lymphocyte

MHC: Major Histocompatibility Complex

Th : Yardımcı T hücre (T Helper Hücre)

V α 24: Variable alfa zinciri

Treg : T regülatör

GVHD : Graft Versus Host Diseas

BHR : B hücre reseptörü (B Cell Reseptor)

NKT : Natural killer benzeri T hücresi

NCI – WG : National Cancer Isntitute-Working Group

LKS : Lenfosit katlanma süresi

B₂MG : B₂ mikroglobulin

TK : Timidin kinaz

LDH : Laktat Dehidrogenaz

sCD23 : Solubl CD23

ATM : Ataksi Telanjektazi Mutasyonu

IL : İnterlökin

TNF α : Tümör Nekroz Faktör-Alfa (Tumor Necrosis Factor – Alfa)

ICAM 1 : İntraselüler Adezyon Molekülü 1

VEGF : Vasküler Endotelyal büyüme faktörü

ITAM : İmmünoresoptor Tirozin Aktivasyon Motifleri

RT – PCR : Ters Transkriptaz- Polimerize Zincir reaksiyonu

FALS : Önden saçılım (Forwart Angle Light Scatter)

RALS : Yandan saçılım (Right Angle Light Scatter)

FL1 : Yeşil Flöresans

FL2 : Kırmızı Flöresans

PBS : Fosfat'la Tampolanmış Tuz

FISH : Flöresans in situ hibridizasyon

DNA : Deoksiribonükleik asit

kDa : Kilo Dalton

TABLolar

Tablo 1 : NCIWG' nin KLL tanı Kriterleri

Tablo 2 : KLL'de RAİ Evrelemesi

Tablo 3 : KLL'de BİNET Evrelemesi

Tablo 4: Çalışmaya Katılan KLL Hastalarının Cinsiyet ve Yaş Dağılımı

Tablo 5: Çalışmaya Katılan KLL Hastalarının Klinik Özellikleri

Tablo 6: ZAP70 Pozitif/Negatif Grupların Kan Sayımı, LDH, Rai Evresine Göre Dağılımı

Tablo 7: CD38 Pozitif / Negatif Grupların Kan Sayımı, LDH, Rai Evresine Göre Dağılımı

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik lenfositik lösemi, erişkinlerde en sık görülen lösemi tipi olup; klinik seyri son derece değişkendir. Bazı hastalarda yavaş seyirli bir klinik gidiş görülürken, kimi hastalarda ise tanıdan kısa bir süre sonra tedavi gereksinimi doğar. Toplam sağkalım süresi hastanın başvuru sırasındaki klinik evresine bağlı olarak aylar ile sınırlı olabileceği gibi on yıllarla ifade edilebilecek kadar uzun olabilir.

Kronik lenfositik lösemi tanılı bazı hastalarda klinik evreden ve günümüz koşullarında bilinen birtakım belirteçlerden bağımsız olarak çok hızlı bir gidiş ve tedavilere yanıtızlık gözlenebilmektedir. Konuyla ilgili olarak ilk kez 1975 yılında Rai ve Binet tarafından bir sınıflama sistemi geliştirilmiştir. Günümüzde de hemen hemen bütün merkezlerde standart olarak kullanılan bu sınıflama sistemlerinin en önemli eksikliği özellikle erken evre vakalarda sınırlı kalmasıdır. Oysa erken evre olarak başvuran olguların yaklaşık %30-40'ı ileri evrelere geçmekte ve hastalık nedeniyle yaşamlarını yitirebilmektedir. Özellikle genç yaşta tanı alan hastalarda hastalığın nasıl gideceğine dair ipuçlarına şiddetle ihtiyaç vardır. Konuyla ilgili olarak yapılan birçok çalışmada bir takım klinik ve laboratuvar belirteçlerin erken dönemde prognozu belirlemeye yardımcı olabileceği gösterilmiştir.

Son yıllarda erken dönem hastalığın gidişini belirlemede kullanılan en önemli belirteçlerden biri İmmünoglobulin ağır zincir değişken bölgesindeki (IgVH) somatik mutasyon olup olmamasıdır. KLL vakalarında IgVH mutasyonu gösterenler iyi bir klinik gidiş göstermesine karşılık mutasyona uğramayanlar mevcut kemoterapotik ajanlara cevap vermeyerek kötü bir gidiş göstermektedir. Bununla birlikte IgVH gen dizisinin belirlenmesi ve mutasyon varlığının araştırılması çok az sayıdaki laboratuvarında teknik olarak mümkündür. Ayrıca moleküler genotipik analiz pahalı bir yöntem olduğundan rutin inceleme ve takip yöntemi olarak kullanılmamaktadır. Bu nedenle yeni çalışmalar bu mutasyon varlığını gösterebilecek farklı yöntemler üzerine yoğunlaşmıştır.

Kronik lenfositer lösemi'de zeta ilişkili protein (ZAP70) ifadenmesi prognozu belirlemede kullanılan bir diğer belirteçtir. ZAP70, T hücrede sinyal iletiminin başlamasında önemli rol oynayan T hücre reseptör (THR) sinyal ileti sisteminde görevli bir protein tirozin kinazdır. Çeşitli klinik çalışmalarda ZAP70 ifadenmesi pozitif hastalarda hastalığın hızlı bir seyir izlediği ve bu hastalarda tedavisiz geçen sürecin kısa, tedavi

ihtiyacının yüksek, sağkalımın düşük olduğu bildirilmiştir. Son dönemde yapılan araştırmalar KLL hücrelerinde saptanan ZAP70 ifadenmesi ile IgVH mutasyonu arasında bir ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu durum her iki belirtisinde hastalığın prognozunu belirlemede kullanılabileceğimize dair ipuçunu vermektedir.

Durig ve arkadaşları yüksek CD38 ifadenmesi ve hastalık seyri arasında ters bir ilişki olduğunu tespit etmiştir. Özellikle çok yüksek CD38 ifadenmesi olan hastalarda hastalığın son derece kötü seyrettiği gösterilen bu çalışmada CD38 ifadenmesinin KLL'li hastalarda bir belirteç olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür. Damle ve arkadaşları ise IgVH mutasyonuna uğramış hücrelerde CD38 ifadenmesinin düşük olduğu saptamışlar ve bunun sonucunda IgVH mutasyonunu göstermede CD38 ifadenmesinin kullanılabileceği öne sürmüşlerdir. Ancak bu durum diğer çalışmalarda gösterilememiş, IgVH mutasyonu ve CD38 ifadenmesi birbirinden bağımsız prognostik faktörler olarak kabul edilmiştir.

B lenfoid hücrelerin farklılaşmasında ve hayatta kalmalarında önemli rol oynadığı gösterilen CD138' in de birçok çalışmada, hastalığın ilerlemesinde etkili olduğu gösterilmiştir.

Doğal bağışıklık elmanı olan Natural killer(NK) hücreleri CD16 ve CD56 ifadenmesi gösterirler. Bu hücrelerde CD3 ifadenmesi yoktur. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda B-KLL hastalarının periferik kanlarında CD3(+) ve CD56(+) olan Natural killer benzeri(NKT) hücreler tespit edilmiştir. Bu hücrelerin varlığı KLL hastalarında bozulmuş sitotoksite nedeni olarak ileri sürülmektedir. Bu çalışmalara dayanılarak CD16 ve CD56 nın da erken evre KLL hastalarda prognozu belirlemede kullanılabileceği düşünülmüştür.

Bu tez çalışmasının amacı, yeni tanı almış veya önceden tanı almış ancak halen tedavisiz izlemde olan KLL hastalarının, kemik iliği aspirasyonlarından alınan kan örneklerinde yeni prognostik belirteçler olarak kabul edilen ZAP70 ve CD38-CD138-CD56-CD16 gibi hücre yüzey antijen düzeylerinin evre ve hastalık seyri arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.LENFOSİTLER

İmmün sistemin temel hücre gruplarından olan lenfositler kandaki çekirdekli hücrelerin ortalama %25'ini oluştururlar. Yaşa göre farklı oranlarda saptanmaktadır. Boyutça küçük lenfositler 7-10 µm çapında çekirdekleri daha koyu renkle boyanan hücreler iken daha büyük boyutlu, LGL (Large Granular Lymphocyte) olanlar 10-12 µm çapında, sitoplâzmaları daha geniş ve granüllü hücrelerdir.

Çevre kanında dolaşan lenfosit alt gruplarını kabaca T, B ve NK (Doğal öldürücü) hücreler olarak sınıflandırabiliriz. Kanda dolaşan lenfositlerin ortalama %80'ini T hücre, %10'unu B hücre geri kalan %10'unu ise NK hücreler oluşturmaktadır. Bu oranlar hücrelerin alındığı dokuya göre değişebilmektedir. Timusta hücrelerin neredeyse %90'ı T hücre iken dalak ve lenf nodunda %30-40 oranında T hücre görülmekte, B hücreler daha baskın oranda (%60-70) izlenmektedir(1).

2.1.1.T Lenfositler

T hücreler kemik iliğinde oluşan prekürsör hücrelerin timusta farklılaşması, olgunlaşması sonrasında çevre kanına çıkarlar. T hücreler, immün yanıtta rollerinin yanı sıra CD4 veya CD8 taşıma özelliklerine göre alt gruplara ayrılırlar. CD4 taşıyan T helper hücrelerinin antikor salınımına yardım ederek immün yanıtta rol aldıkları, CD8 taşıyan hücrelerin ise sitotoksik T lenfositler oldukları düşünülse de son yıllarda yapılan araştırmalara göre durum daha karmaşık hale gelmiştir. Günümüzde THR(T hücre reseptörü) ile etkileşimlerine göre ayırım yapılması uygun görülmüştür. CD4⁺ T lenfositler MHC Sınıf II aracılığı ile antijen tanırken, CD8 hücreler MHC Sınıf I aracılığı ile antijen tanımaktadırlar. T lenfositler salgıladıkları sitokin profili ile de uyumlu olarak Th0, Th1, Th2, Th17 gibi alt gruplara da ayrılmaktadırlar. Dolaşımdaki T hücrelerin yaklaşık %95'i THR alfa/beta pozitifdir, CD4 ya da CD8 pozitifliği taşımayan <%5 oranındaki T lenfositler ise THR gamma/delta pozitifdirler. NKT hücreleri olarak adlandırılan bir alt grup ise CD4 ya da CD8 ile birlikte tek bir V (variable) alfa zinciri (Vα24) taşırlar, antijenik yapıları MHC üzerinden değil dendritik hücreler üzerinde var olan CD1a üzerinden tanılır. Erişkin kanında %1-4 oranında saptanabilen Treg (T regülatör) hücreler ise bir diğer alt gruptur.

Treg hücrelerin immün yanıt düzenlenmesinde etkin rol aldıkları, otoimmünite olgularında azalırken kanserde arttıkları, GVHD (Graft versus Host Disease) oluşmasında da rolleri olduğu bildirilmektedir.

2.1.2.B Lenfositler

B hücreler 7-10 µm çapında lenfositlerdir. Diğer belirteçler yanında yüzey immunoglobulin, özellikle IgM ve IgD taşırlar, düşük oranda IgG ve IgA taşıyabilmektedirler. B hücrelerden gelişen plazma hücreleri (10-15 µm) normalde dolaşımda bulunmazlar, bölünme yetileri yoktur, immunoglobulin üretme görevlerini yerine getirirler. CD19, CD20 pozitifliklerinin yanı sıra CD40, CD79, HLA-DR, FcγRII reseptörleri (CD32) ve kompleman reseptörleri CD21, CD35 taşırlar. T hücrelerdeki THR benzeri BHR (B Hücre Reseptörü) kompleksini B hücrelerde CD19, CD21 ve CD81 in oluşturduğu bilinmektedir.

2.1.3.NK ve NKT Hücreler

NK (Doğal Öldürücü) Hücreler doğal bağışıklık sisteminin parçasıdır, diğer lenfositlere göre daha granüllü hücrelerdir. Etkileri sitotoksik T lenfositlere benzerdir, ancak reseptörleri farklıdır ve somatik rekombinasyon genleri ile kodlanmazlar. Sadece NKT hücreleri adı verilen düşük oranlı bir NK hücre grubu somatik rekombinasyonla kodlanan alfa/beta reseptörlerini taşır. Doğal öldürücü (NK) hücreleri yüzeylerinde CD16, CD16+56+, CD49b, CD56, CD57, CD314, CD335, CD336, CD337 taşırlar(2), fenotipik antijenleri CD56 ve çoğunlukla CD16(Fc gama RIII) olarak kabul edilir.CD3 eksik yani negatiftir. Sitotoksik etkilerini granzyme ve perforin salımı ile gösterirler.

Çalışmalar dolaşımdaki NK hücrelerinden farklı sitokin profillerine sahip efektör NK hücre alt gruplarına dönebileceğini ve farklı enflamatuar özellikler kazanabileceğini desteklemektedir.CD3 antijeni eksprese etmeyen NK hücrelerine karşılık, CD3 antijenini ve NK hücrelerinde bulunan reseptörlerin çoğunu eksprese eden hücreler NKT hücreleri olarak adlandırılmaktadır. NKT hücreleri, NK hücreleri ve konvansiyonel T hücrelerinin özelliklerini paylaşan T hücre alt grubudur(94).

Son yıllarda kabul gören sınıflandırmalara göre, T lenfositler alfa/beta ve gamma/delta T lenfositler olarak iki ana gruba ayrılmakta NKT hücreleri ayrı bir alt grup olarak incelenmektedirler(94).

2.2.KRONİK LENFOSTİK LÖSEMI

KLL, monoklonal CD5 pozitif B lenfositlerinin periferik kan, kemik iliği ve ikincil lenfoid organlarda (lenf nodu ve dalak) toplanması ile şekillenen bir hastalıktır(3,4).

KLL, batı toplumunda, erişkinlerde, en sık görülen lösemi türüdür(4). Bu ülkelerde yasayan 65 yaşının üstündeki kişilerde gelişen lösemilerin % 40'ını oluşturur(5). Genç yasta görülmesi nadir olmasına karşın KLL hastalarının % 20-30'u 55 yaş altındadır(6). KLL, erkeklerde kadınlara göre daha sık gözlenir ve E/K oranı yaklaşık olarak 1,5 - 2,1:1'dir(4).

KLL'li olguların periferik yaymasında, çok az stoplazması olan, homojen, olgun lenfositler izlenir. Hücre membranları oldukça frajildir ve sıklıkla preparatın hazırlanma aşamasında lösemik hücreler rüptür olurlar. KLL B lenfositlerinin yüzeylerinde CD19, CD20,CD5 ve CD23 ifadelenir. Tipik olarak düşük derecede yüzey immünglobulini taşırlar (sıklıkla IgM ± IgD ve düşük oranda IgG ya da IgA). Lösemik hücreler monoklonal olduğu için kapa ya da lambda hafif zincirlerinden sadece biri ifadelenir(4).

2.2.1. Tanı

NCI-WG ölçütlerine (7) göre aşağıdaki durumların varlığında KLL tanısı konulabilir:

1.Periferik kanda 1 aydan uzun süredir $5 \times 10^9 /L$ 'den fazla olgun görünümlü lenfosit olması

2.Akım sitometri ile aşağıdaki özelliklerin saptanması

a. B lenfositler sadece kappa veya lambda ifadelenmesiyle gösterildiği gibi monoklonaldır

b. CD19 + CD5'le birlikte CD23 ifadelenmesi

c.Yüzey Ig'nin düşük derecede ifadelenmesi ve bundan dolayı CD79b'nin ifadelenmesinin olmaması ya da düşük düzeyde olması

Kemik iliği incelemesi, KLL tanısı için gerekli değildir fakat sitopeninin nedeninin belirlenmesinde ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde çok yararlı olabilir (7,8,9). Atipik morfoloji gösteren KLL'de tanının desteklenmesini sağlayabilir. İnfiltrasyon tipi (yaygın ya da yaygın olmayan) hastalık seyrini önceden kestirmede kullanılan klasik işaretlerdendir(10).

Parametre	Kriterler
Lenfositoz	$>5 \times 10^9 / \text{lt}$
İmmünotipik Bulgular	En az 1 adet B hücre işaretleyicisi (CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD23 ⁺)+CD5 ⁺
Atipik hücre oranı	$< \% 55$
Kemik iliği lenfosit oranı	$\% 30$ veya üzerinde

Tablo 1: NCIWG' nin KLL tanı Kriterleri(1996)

2.2.2. Klinik

KLL hastalarının çoğu tanı anında asemptomatiktir ve genellikle rutin kan sayımları ile karsımıza çıkar(11,4). Buna karşın kimi olgularda, hücre topluluğunun kemik iliği ve periferik kanda birikmesinin yol açtığı etkiler sonucu belirtiler ortaya çıkar. Lenfadenopati, kilo kaybı, gece terlemesi, ateş yüksekliği gibi yakınmalar olabilir.

Hastalar, aneminin neden olduğu yorgunluk ve fiziksel aktivitelerinin kısıtlanmasından yakınabilirler(4).

Hastaların en az $\% 60$ 'ında hipogamaglobulinemiyle birlikte şiddetli ve tekrarlayıcı enfeksiyonlar bildirilmiştir(12). Enfeksiyonlar KLL ile ilgili ölümlerin en sık sebebidir(4). Otoimmün olaylar KLL'de sık görülür ve sıklıkla kan hücrelerine karşıdır(13). Otoimmün hemolitik anemi olguların $\% 10-25$ 'inde, immün trombositopeni hastaların $\% 2$ ' sinde görülürken nötrofillere karşı otoantikolar ve pure red cell aplazi nadir görülür(4).

2.2.3. Klinik Evreleme

Klinik evreleme sistemi, 1975’de Rai ve arkadaşları tarafından lenfadenopati, organ büyüklüğü (dalak ve karaciğer) ve sitopeniler temel alınarak geliştirilmiştir(14). Orijinal Rai evreleme sistemi daha sonra 5 gruplu sistemden (0-IV) 3 gruplu sisteme değiştirilmiştir. Hastalar düşük risk (orijinal Rai evre 0), orta risk (orijinal evre I-II) ve yüksek risk (orijinal evre III-IV) olarak gruplandırılmıştır(15).

KLL’nin evrelemesinde günümüzde 2 sistem kullanılmaktadır:

RAİ EVRELEMESİ

Evre	Klinik Özellikler
0	Lenfositoz
I	Lenfositoz + Lenfadenomegali
II	Lenfositoz + Splenomegali ve/veya Hepatomegali
III	Lenfositoz + Anemi (Hb< 11g/dl)
IV	Lenfositoz + Anemi + Trombositopeni (<100 000/mm ³)

Tablo 2: KLL’de RAİ Evrelemesi(14)

BİNET EVRELEMESİ

Evre	Kan Sayımı	Tutulan Lenfoid Bölge
A	Hb> 10 g/dl Trobosit> 100 000/mm ³	<3
B	Hb> 10 g/dl Trobosit> 100 000/mm ³	≥3
C	Hb< 10 g/dl Trobosit< 100 000/mm ³	Önemsiz

Tablo 3: KLL’de BİNET Evrelemesi(18)

2.2.4.Prognoz

KLL, son derece değişken klinik davranış biçimleri gösterir. Toplam sağkalım aylar ile sınırlı olabileceği gibi dekadlar ile ifade edilebilecek kadar uzun olabilir(11). KLL'de ortalama sağkalım yaklaşık olarak 7,5-10 yıldır(4,9).

Kimi hastalarda belirti yoktur ya da hastalıklarının seyri boyunca çok az belirti ve bulgular görülür(11). Diğer yandan kimi hastaların lenfosit sayıları hızla artar, organ büyüklüğü gelişir, hemoglobun ve platelet sayıları azalır, belirtiler artar ve tanıdan kısa bir süre sonra tedavi ihtiyacı duyarlar(11,4). Bu hastalarda yaşam beklentisi birkaç yıldır(4).

KLL'de, hastalığın biyolojik özellikleri ve klinik seyir, genç (<55 yaş) ve yaşlı hastalarda benzerdir. Her iki grupta da toplam yaşam beklentisi 10 yıl civarındadır, fakat iki grup arasında ölümün nedenleri farklıdır. Yaşlılar çoğunlukla KLL ile ilişkisiz nedenler ve ikincil tümörlerden ölürken genç hastalar KLL ile ilişkili nedenlerden kaybedilirler(4).

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

2.2.4.1. Klinik Prognostik Faktörler

Geleneksel klinik prognostik faktörler 3 tanedir:

a) Rai veya Binet klinik evre: Rai ve arkadaşları, Rai evrelemesi ile sağkalım arasındaki ilişkiyi göstermişlerdir. Ortalama sağkalım; Evre 0'da 150 ay, evre I'de 101 ay, evre II'de 71 ay, evre III ve evre IV'de yaklaşık 19 aydır(14). Binet evrelemesine göre; Evre A'da sağkalım yaş uyumlu kontrol grubundan farksız, evre B'de 84 ay, evre C'deyse 24 ay olarak saptanmıştır(18).

Klinik evreler, erken, orta ve ileri olarak sınıflandırıldığında; erken (Rai 0, Binet A), orta(Rai I/II, Binet B) ve ileri (Rai III/IV, Binet C) evrelerde yaşam süreleri sırayla >10 yıl, 5-7 yıl ve 1-3 yıldır(11).

Görüldüğü gibi Rai evre 0 ve Binet evre A diğer evrelerle karşılaştırıldığında daha iyi prognoza sahiptir(7). Bununla birlikte aynı grupta olup farklı klinik seyir gösteren hastalar da olması klinik evreleme sistemlerinin, erken evrede tanı konmuş KLL hastalarının

hangilerinin daha sonra hızlı seyredeceğini ayırmada yetersiz olduğunu göstermektedir(11).Hastaların % 80'inden fazlasına erken evrede tanı konulması klinik evrenin prognozda kullanımını sınırlandırmaktadır(11,19).

b)Lenfosit katlanma süresi: LKS, mutlak lenfosit sayısının ikiye katlanma zamanının ay olarak belirlenmesiyle hesaplanır(20). Çoğalma hızını, basit metotla ölçen yararlı bir prognostik belirteçtir(21). NCI kılavuzunda, LKS'nin 6 aydan daha kısa olmasının tedavi endikasyonu olduğu belirtilmiştir(7).

Bir çalışmada, LKS 12 ay ya da daha kısa olan hastaların ortanca sağkalım süreleri 61 ayken, LKS 12 aydan uzun olan hastaların ortanca sağkalım süresine çalışma süresi içinde ulaşılmamıştır (ortanca takip süresi, 118 ay). Bu çalışma, klinik evre ve infiltrasyon tipiyle ilişkili olmasına karşın, LKS'nin bağımsız prognostik önemini göstermiştir(22).

Diğer çalışmalar da erken evre hastalarda, LKS'nin yararını desteklese de(21), klinik kullanımında önemli bir sorun vardır. LKS geriye dönük hesaplanır ve zamanla ilgili değişikliklerden tümüyle etkilenebilir(20). Enfeksiyonlar ya da kortikosteroid tedavisiyle lenfosit sayısının değişmesi, LKS'nin kullanımında güçlük yaratmaktadır(19). Tedavi kararında LKS'nin temel alınması hızlı seyirli kimi hastalarda tedavinin gecikmesine yol açabilir(23).

c)Kemik iliği infiltrasyon tipi: KLL 'de interstisyel, nodüler, karışık (interstisyel ve nodüler) ve yaygın olmak üzere 4 farklı kemik iliği infiltrasyon tipi tanımlanmıştır(24,8).

Bunlar:

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

İnterstisyel, nodüler ve karışık tip sınırlı tutulum olarak gruplandırılmıştır(8). Yaygın infiltrasyon tipi kötü prognozla ilişkilidir(4). Sınırlı infiltrasyon tipine sahip KLL hastalarında sağkalım daha uzundur(25,24). Bu infiltrasyon tipleriyle, Rai klinik evresi arasında önemli ilişki mevcuttur(26). Benzer ilişki Binet evreleme sistemiyle de gösterilmiştir(24).

2.2.4.2. Serolojik Belirteçler

a) β 2 mikroglobulin: KLL hastalarında, hastalık evresi ve tümör yüküyle ilişkili bir serum belirteçidir. β 2MG düzeylerinin kemoterapi yanıtı ve toplam sağkalım ile ters ilişkili olduğu gösterilmiştir(4). Tedavi almamış 302 hastada β 2MG'in çok değişkenli analizde, 5 yıllık sağkalım üzerine güçlü belirleyici etkisi saptanmıştır. Beş yıllık sağkalım, yüksek β 2MG olan Rai evre I-II hastalarda 54 ay, normal β 2MG olanlarda 116 ay bulunmuştur(20). Buna karşın 106 tedavi almamış hastayla yapılan bir diğer çalışma, β 2MG'in, çok değişkenli analizde tek başına sağkalım üzerine önemli bir belirleyici etkisi olmadığını göstermiştir(27).

β 2MG'in, KLL'de prognostik önemi olsa da bu belirtecin evre ve LKS'nden bağımsız olduğunu gösterecek ve erken evre KLL hastalarındaki rolünü tanımlayacak ek çalışmalara ihtiyaç vardır(20).

b) Serum timidin kinaz aktivitesi: TK, DNA sentezinde rol alan hücresel enzimdir(20). Serum TK aktivitesi, muhtemelen neoplastik hücrelerin bölünme sayısı ile ilişkilidir. Tümör kitlesinin ve tümör hücrelerinin çoğalma derecesini yansıttığı düşünülmektedir(28).

Erken evre KLL hastalarında, prognozun değerlendirilmesinde yararlı olduğu bulunmuştur(29,23). Serum TK aktivitesi sağ kalım ile ters ilişkilidir(4,29). Rutin laboratuvarlarda çalışılmaması klinikte kullanımını sınırlamaktadır.

c) Serum LDH düzeyi: LDH, farklı genlerden kodlanan, 5 tetramerik izoenzimden oluşur(30). Tümör saldırganlığını ya da yüksek tümör yükünün tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır(31).LDH yüksekliğinin hücre çoğalmasını yansıttığı düşünülmektedir(30).

Yapılan bir çalışmada, normal B hücrelerindeki LDH aktivitesinin, B-KLL hücrelerine göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir(32). 190 KLL'li hastada yapılan çalışmada LDH ile toplam sağkalım ve tedavisiz izlem süresi arasında önemli ilişki saptanmıştır(33).

d) Serum sCD23 düzeyi: CD23, B-KLL hücrelerinde yüzey molekülüdür. Yüksek serum düzeyleri, kötü prognoz belirteçidir(34). sCD23 düzeyi toplam sağkalım ve Binet evre A hastalarında hastalık ilerlemesiyle ters ilişkilidir(34). Bununla birlikte bağımsız prognostik önemi kanıtlanmamıştır(28).

2.2.4.3.Yeni Biyolojik Faktörler

1) İmmünglobulin ağır zincir gen mutasyon durumu: Normal B hücre olgunlaşması, germinal merkez içerisinde antijenle karşılaştıktan sonra oluşan ağır zincir genlerinin somatik mutasyonunu içermektedir(35). KLL, pregerminal merkezde Ig mutasyonu olmayan B hücreleri ve germinal merkezden geçerken Ig mutasyonu oluşan B hücreleri olarak iki farklı formdan oluşur(36).

Lösemik hücrelerin immünglobulin ağır zincir değişken gen bölgesinin somatik mutasyonu, KLL hastalarının % 50 ila % 70'inde gösterilmiştir(37). Erken evredeki hastalarda, klinik evreden ve sitogenetik anormalliklerden bağımsız olması, IgVH mutasyon durumunun prognostik önemini göstermektedir(2).

KLL hastalarında sağkalımın, IgVH mutasyon durumuyla ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Sağkalım avantajı erken evre hastalarda da gösterilmiştir. KLL'de, geriye dönük çalışmalar da, IgVH mutasyonu daha iyi prognoz ile ilişkili bulunmuştur. Mutasyonsuz KLL'de ortalama sağkalım 79-119 ay, mutasyonlu KLL'de 293 aydır. IgVH mutasyonu olmayan hastalarda IgVH mutasyonu olan hastalara göre ilerleyici hastalık, atipik lenfosit morfolojisi, olumsuz sitogenetik özellikler ve tedaviye direnç daha fazladır(38,39,40).

Bununla beraber IgVH mutasyonunun analizi, karmaşık, pahalı ve çalışma süresi uzundur(39,20). Bu nedenle rutin tanısal laboratuvar testi olarak kullanılması uygun değildir(41).

2) CD38 ifadenmesi: CD38, 1980 yılında T hücre farklılaşma antijeni olarak tanımlanmıştır(42). Takip eden yıllarda birkaç çalışmada CD38 ifadenmesinin, T hücreleri ile sınırlı olmadığı ve farklı hematopoetik ve nonhematopoetik dokularda büyük oranda ifadelendiği gösterilmiştir(43,44). Hematopoetik hücrelerde CD38 ifadenmesi, bu hücrelerin olgunlaşma ve aktivasyon evreleriyle ilişkilidir. CD38, CD34 pozitif progenitor hücrelerde, uyarılmamış pregerminal merkez B hücrelerde, germinal merkez B hücrelerde,

aktive olgun lenfositlerde, plazma hücrelerinde ve myeloid prekürsörlerde ifadenir(45). B hücrelerde CD38'in fonksiyonu kesin olarak tanımlanmamıştır(46). KLL'li olgularda CD38 ifadenmesi farklıdır ve prognostik değeri vardır(38,45). Bu konu ile ilgili ayrıntılı bilgi ileride verilecektir.

3) KLL hücrelerinde ZAP-70 ifadenmesi: Lösemik hücrelerde ZAP 70 ifadenmesinin % 20'den fazla olması kötü prognostik özelliştir(49,68,48,51,52). Bu konu ile ilgili ayrıntılı bilgi ileride verilecektir.

4) Kromozom anormallikleri: Kromozomal anormalliklerinin tanınmasıyla KLL hastalarının farklı prognoza sahip alt grupları belirlenebilmiştir(53).

KLL'de konvansiyonel bantlama teknikleri, neoplastik hücrelerde düşük mitotik indeks olması ve metafaz kalitesinin suboptimal olmasından dolayı zordur(28,53). FISH, metafaz ve interfaz hücrelerinin her ikisinde de özgün kromozomal anormallikleri saptamaya olanak sağlar(54). Konvansiyonel sitogenetik çalışmalar ile KLL hastalarının % 30-40'ında sitogenetik anormallikler gösterilirken FISH'da çoklu prob kullanılarak bu oran % 80'e ulaşmaktadır(54). Konvansiyonel itogenetik yöntemlerle en sık trizomi 12 ve 13q14 ve 14q32 kromozomal anormallikleri saptanır. FISH ile en sık 13q delesyonu saptanmaktadır(53).

Döhner ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, 13q delesyonu, 11q delesyonu, trizomi 12, 17p delesyonu, 6q delesyonu, trizomi 8, 14q32 translokasyonu ve trizomi 3 anormallikleri FISH'le olguların % 82'sinde gösterilmiştir. Bu çalışmada, 13q delesyonu % 55, trizomi 12q % 14, 11q delesyonu % 17, 17p delesyonu % 7, diğer anormallikler % 8, gösterilemeyen lezyonlar % 18 olarak bulunmuştur. 17p ve 11q delesyonunda klinik gidiş kötü ve sağkalım süresi kısa, tek 13q delesyonunda ise sağkalım uzundur. Trizomi 3, 6q delesyonu, trizomi 8 ve 14g32 translokasyonunun bulunduğu hastaların ortanca sağkalım sürelerine çalışma içinde ulaşamamıştır(53).

17p delesyonu

17p delesyonu, KLL olgularında % 7-12 oranında görülür(53,55). 17p13 bölgesinde bulunan p53 tümör baskılayıcı gen programlı hücre ölümünün düzenlenmesinde anahtar moleküldür(55,56).

Yapılan bir çalışmada 17p delesyonunun yas ile ilişkili olduğu ve yaslı KLL hastalarında daha sıklıkla görüldüğü rapor edilmiştir(57). KLL'de, 17p13 kromozom bölgesinin delesyonunda prognoz kötüdür. Hastalık ilerlemesinin 1-2 yıl içerisinde olacağını gösterir ve göreceli olarak kemoterapi direnci söz konusudur(40). 17p delesyonu, hastalıkla ilişkili ölümün güçlü bağımsız bir belirleyicisidir ve bu hastalarda ortalama sağkalım 32 aydır(53). Aynı zamanda 17p delesyonu kısa tedavisiz izlem süresiyle de ilişkilidir(54).

11q22-23 delesyonu

Bu delesyon, tüm KLL hastalarının % 12-21'inde rapor edilmiştir(53). Kromozom 11'in uzun kolunda bulunan q22-23 bölgesinin delesyonunda, prognoz kötüdür. Delesyon ATM bölgesini içermektedir. Bu genin nörolojik rahatsızlık ve tümör oluşum riskinin artması ile karakterli hereditör bir sendrom olan ataksi telanjektaziden sorumlu olduğu bilinmektedir. ATM'nin apoptozis yolunda önemli sinerjistik etkisi bilinmektedir ve yetmezliği durumunda KLL dışı lenfoproliferatif rahatsızlıkları da içeren bazı malinitelerin sıklığının arttığı görülmüştür(55). Normal ATM, p53 ile ilişkili apoptotik yolun aktivasyonunda baskın rol oynar(56) ve kaybında p53 eksikliğine benzer sonuçlar görülür(55).

11q delesyonu daha çok genç olgularda görülür. Bu delesyonun büyük lenf bezleri ilişkili olduğu gösterilmiştir. 11q delesyonunun olduğu hastalarda ortalama sağkalım süresi 79 aydır(53).

Trizomi 12

Yetersiz kalitedeki karyogramlarda bile kolaylıkla tanınır(55). FISH çalışmalarında yaklaşık % 15-18 oranında rapor edilmiştir. Trizomi 12 sıklıkla diğer karyotip anormallikleri ile birlikte(55). Trizomi 12, lösemik hücrelerde atipik morfolojiyle ilişkili olup hastalarda 6q delesyonu daha sıklıkla gözlenir ve lenfositleri plazmasitoid özellik sergiler. Trizomi 12'nin prognozu ortadır ve sağkalım süresi ortalama 114 aydır(53).

13q delesyonu

KLL'de 13q14 delesyonu çok sıktır, olguların % 40-65'inde rapor edilmiştir. 13q delesyonu olasılıkla tek bölge (q14) ile sınırlıdır ya da kromozom 13'ün uzun kolundaki büyük interstisyel bölgenin kaybı buna eşlik eder. Olguların yaklaşık olarak üçte birinde

her iki allel delesyonu birden görülür(55). Sadece 13q delesyonu varsa prognoz iyidir(35,40). 13q delesyonunda ortanca sağkalım ortalama 133 aydır(53). Takipte başka kromozomal anormallikler oluşursa 13q14 delesyonunun olumlu etkisi ortadan kalkar(55).

Daha az sıklıkla görülen kromozomal anormallikleri

KLL olgularının % 2-6'sında görülen(55) 6q delesyonu (çoğunlukla 6q21-23) diğer lenfatik malinitelerde de görülebilir(58). 6q delesyonu olan olgularda, prognoz ortadır(58).

Trizomi 8, 14q32 translokasyonu ve trizomi 3 anormallikleri de tanımlanmıştır(53,55). Bu anormalliklerde sağkalım daha iyidir(53).

KLL'de normal karyotip

KLL olgularının % 20-40'ında, gelişmiş sitogenetik teknolojilerin kullanılmasına rağmen genetik bozukluk gösterilemez. Döhner ve arkadaşlarının çalışmasında, olguların % 18'inde FISH'le sitogenetik anormallik gösterilememiştir(53). Sitogenetik bozukluğun olmaması iyi klinik prognozla kendini gösterir(53,55). Bu hastalarda sağkalım süresi 111 aydır(53).

2.2.4.4. Diğer Prognostik Faktörler

KLL'de bazı sitokin, enzim ve moleküler belirteçlerin de prognostik faktör olabileceği düşünülmektedir(20). Bunlar arasında IL-6(60), IL-10(60), TNF- α (61), intraselüler Bcl-2(64) ve ICAM1(62) bulunmaktadır. Ayrıca KLL'de sağkalım ile vasküler faktörler arasında ilişki gözlenmiştir(20). VEGF, tümör anjiogenezinde önemli bir aracıdır. Binet evre A ya da Rai evre I-II olup serum VEGF düzeyi ortanca değer üzerinde olan hastalarda, ilerlemesiz sağkalım önemli derecede kısa saptanmıştır(63).

2.3. IgVH MUTASYONU

B lenfositleri, gelişimleri sırasında çok çeşitli antijenleri tanıyabilme ve onlara karşı antikor yapabilme kapasitesine sahiptirler. Hücrelerin erken gelişim döneminde immünoglobulin ağır (VH) zincirinin V ve D gen bölümleri, J bölümüyle kendine özgü rekombinasyon yapar ve lenfositler yeni bir VDJ genetik yapı yaratır. VDJ seçildikten sonra, antijene maruz kalan lenfositler germinal merkezde somatik mutasyona uğrarlar. Somatik mutasyonlar, VH zincirinin değişken bölgesinde, gen segmentlerinde immünoglobulin molekülü için gerekli kodları sağlamak amacıyla gerçekleşmektedir. Bu

işlem ile IgVH gen bölgesine rastgele seçimli nukleotidler yerleşerek ve antijene tam uyumlu antikörler sentezlenir(65).

KLL hastalarında yapılan araştırmalarda KLL hücrelerinin iki farklı gruba ayrıldığı saptanmıştır: IgVH mutasyonu olmayan birinci gruptaki hastalarda lösemik hücreler pregerminal merkez kaynaklı olup ikinci gruptakiler ise somatik mutasyona uğramış germinal merkez veya germinal merkez sonrası hücrelerdir. %50'sinde IgVH mutasyonu görülen KLL hastaları, iyi bir klinik gidiş gösterirler, mutasyonu olmayanlara göre daha az tedaviye ihtiyaç duyarlar ve tedavisiz geçen süre daha uzundur; yaşam süreleri de, mutasyonu olmayanlara göre dikkate değer derecede uzundur. IgVH gen mutasyonu yeni ve iyi bir prognostik faktör olarak ortaya konmuştur(51,67,68,38).

Pregerminal merkezli lösemik hücrelerde CD38 ifadenmesinin yüksek, ancak mutasyona uğramış hücrelerde düşük olduğu, IgVH mutasyonunu göstermede CD38 ifadenmesinin kullanılabileceği öne sürülmüştür. Ancak ilerleyen araştırmalarda, IgVH mutasyonu ve CD38 ifadenmesi birbirinden bağımsız prognostik faktörler olarak değerlendirilmektedir(49,52,72).

IgVH mutasyonu içeren olguların, DNA "microarray" kullanılarak yapılan çalışmalarda IgVH mutasyonu içermeyenlerden bazı gen alt-grupları açısından farklılık gösterdiği ortaya konmuştur. ZAP70 gen ifadenmesinin IgVH mutasyonu ile korelasyon gösterdiği saptanmış olup IgVH mutasyonunun olmadığı olgularda ZAP70 ifadenmesinin olduğu gözlenmiştir. IgVH mutasyonu pahalı, tespiti zor ve ancak belli merkezlerde yapılabilen bir inceleme olması nedeniyle bunun yerine, rutin laboratuvarlarda uygulanması kolay ve ucuz olan ZAP70 kullanılması düşünülmüş olup bu konuda çalışmalar devam etmektedir(36).

2.4.ZAP-70

ZAP-70, 70 kDa ağırlığında bir proteindir ve 2. kromozomun 2q2 bölgesinde kodlanır(74). Syk-ZAP-70 tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir ve T hücre reseptöründen sinyal iletimiyle ilişkilidir(75,76,77). ZAP-70'in KLL'de, B hücre reseptör sinyali ile ilişkili olduğu gösterilmiştir(78,79).

ZAP-70, 619 aminoasit uzunluğundaki 3 zincirden oluşur. Tirozin kinaz alanları, SH adında 3 ana alan içerir. SH1 bölgesi enzimatik aktivite içerir, SH2 özellikle protein-protein

etkileşimini ve özgün olarak fosfotirozinleri tanıyarak fosforilasyonu kontrol eder ve SH3,protein etkileşimleri için daha özgün tanınmaları sağlar. ZAP-70'in N terminalinin sonunda iki SH2 bölgesi, karboksi terminalindeyse katalitik bölgeler bulunur. ZAP-70'in SH2 bölgesi ve syk immün reseptörler üzerinde bulunan ITAM olarak adlandırılan immünreseptör tirozin tabanlı aktivasyon motiflerini özgün olarak tanır(74).

Periferal kanda, NK ve T hücrelerinde ZAP-70 ifadenmesi yüksek olarak görülürken B hücrelerinde ifadenme yoktur(80,75,76,77). Son zamanlardaki çalışmalarda aktive tonsil ve dalak B hücreleri ve kemik iliği pro-B hücreleri gibi kimi B hücre alt gruplarında, ZAP-70 ifadenmesinin olduğu gösterilmiştir(81,82). Periferik kana göre kemik iliğindeki B-KLL hücrelerinde ZAP-70 ifadenme düzeyi daha yüksektir(83).

Chen ve arkadaşları, ZAP-70 ifadenmesinin KLL hücrelerinde BCR aracılı sinyal iletimini artırdığını ileri sürmüşlerdir(78). İntraselüler sinyalin artması KLL hücrelerinde sağkalımı ve çoğalmayı etkileyebilir(84).

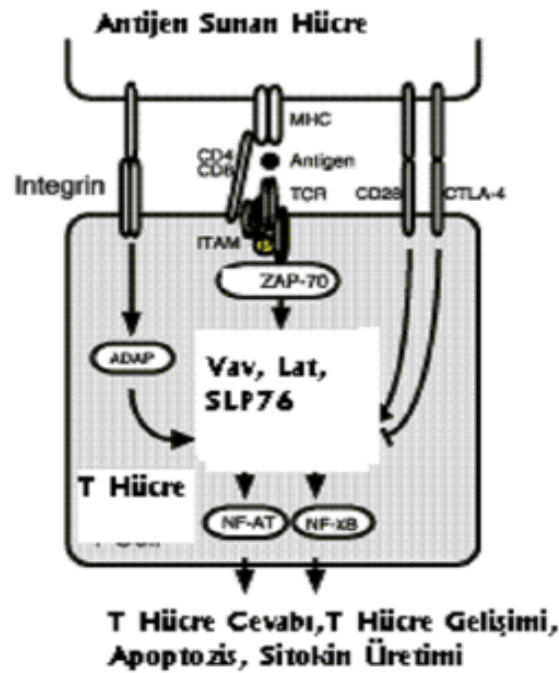
ZAP-70 ifadenmesi, Western blot, kantitatif RT-PCR, immünohistokimyasal olarak ve akım sitometri gibi farklı yöntemlerle ölçülebilir(74,49). Akım sitometri hematolojik malinitelerin tanısında kullanılan kesin ve hızlı bir yöntemdir(80). Akım sitometriyle KLL hücrelerinde, T hücrelerinde ve NK hücre gruplarında, ZAP-70 pozitif hücre yüzdesi analiz edilebilir(49). Karşıt olarak, Western blot ve RT-PCR'da, örneklerde T hücreleri de bulunduğu için ZAP-70 ifadenmesi olduğundan daha yüksek bir değerde saptanır(78,36). Rassenti ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, akım sitometri ve immün blot yöntemiyle analiz edilen ZAP-70 ifadenme düzeyleri ilişkili bulunmuştur(52). Akım sitometri ile RT-PCR yönteminin, 28 hasta üzerinde karşılaştırıldığı başka bir çalışmada da sonuçlar ilişkili bulunmuştur(68).

Lösemik hücrelerde, ZAP 70 ifadenmesinin % 20'den fazla olması kötü prognostik özelliktir. ZAP-70 ifadenmesi, B-KLL 'de hastalık ilerlemesi ve toplam sağkalımın önemli bir belirleyicisi olarak tanımlanmıştır(49,68,48,51,52). Bir çalışmada ZAP-70 negatif olan KLL'li hastaların ortanca yaşam süreleri 24,4 yılken ZAP-70 pozitif olan hastaların ortanca yaşam süreleri 9,3 yıl olarak saptanmıştır(51). Yapılan bir çalışmada ilerlemesiz sağkalım üzerine ZAP-70, sCD23 ve modifiye Rai evresinin bağımsız prognostik faktör olduğu

saptanmış, toplam sağkalım açısından sadece ZAP-70'in bağımsız belirleyici bir faktör olduğu rapor edilmiştir(84).

ZAP-70 ifadenmesiyle ağır zincir gen mutasyon durumu arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır(49,52). IgVH mutasyon durumunun belirlenmesi zor ve zaman alıcı olduğu için bunun yerine ZAP-70'in kullanılabileceği belirtilmektedir(49).

ZAP-70 ifadenmesi, tedavi gereksiniminin erken bir belirleyicisi olduğu gibi bazı çalışmalarda tedavi yanıtında da rolü olduğu gösterilmiştir. ZAP-70 negatif grupta, fludarabin kemoterapisiyle tam yanıt oranı, ZAP-70 pozitif gruba göre anlamlı olarak fazla bulunmuştur(84). Kimi çalışmalarda, ZAP-70 pozitif hastaların ZAP-70 negatif gruptaki hastalara göre daha yoğun kemoterapi gereksinimi olduğu rapor edilmiştir(68,17).



2.5.CD38

CD38, 1980 yılında T hücre farklılaşma antijeni olarak tanımlanmıştır(42). Takip eden yıllarda birkaç çalışmada CD38 ifadenmesinin, T hücreleri ile sınırlı olmadığı ve farklı hematopoetik ve nonhematopoetik dokularda büyük oranda ifadelendiği gösterilmiştir(43,44). Hematopoetik hücrelerde CD38 ifadenmesi, bu hücrelerin olgunlaşma ve aktivasyon evreleriyle ilişkilidir. CD38, CD34 pozitif progenitor hücrelerde,

uyarılmamış pregerminal merkez B hücrelerde, germinal merkez B hücrelerde, aktive olgun lenfositlerde, plazma hücrelerinde ve myeloid prekürsörlerde ifadenir(45). B hücrelerde CD38'in fonksiyonu kesin olarak tanımlanmamıştır(46). KLL'li olgularda CD38 ifadenmesi farklıdır ve prognostik değeri vardır(38,45).

CD38'in yüksek oranda ifadenmesi, ileri evre hastalık ve kemoterapiye kötü yanıtla ilişkilidir(47). CD38 ifadenmesi yüksek olan hastalarda, neoplastik hücrelerde atipik morfoloji, yaygın kemik iliği infiltrasyonu ve periferik lenfosit sayısında yükseklik daha sık gözlenir(45). Bu hastaların sağkalım süreleri daha kısadır(47,4,45,33). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada CD38 pozitif olan KLL hastalarında, negatif olanlara göre tedavisiz izlem süresinin daha kısa olduğu gösterilmiştir(33).

Günümüzdeki farklı çalışmalarda CD38 ifadenmesinde eşik değeri konusu tartışmalıdır(4). Bazı çalışmalarda eşik değer olarak % 30'un kullanılması önerilmiştir(48). Sonraki çalışmalarda % 7 (40), % 5 (19) gibi eşik değerlerin de pronozda önemli olduğu bildirilmiştir. CD38 ifadenmesinin zaman içerisinde değişebileceği rapor edilse(48,40,28) de yakın zamanda yapılan bir çalışmada, 6 yıllık bir dönemde CD38 düzeyinin değişmediği gösterilmiştir(33). CD38'in bağımsız bir prognostik faktör olduğu düşünülmektedir(48).

Damle ve arkadaşları ile Hamblin ve arkadaşları B hücreli KLL'nin mutasyon olmamış ön germinal merkezli B hücrelerinin immünooglobulin ağır zinciri veya daha olgun germinal merkez zonlu somatik mutasyonlu IgVH genlerinden kaynaklandığını göstermişlerdir(38,39). Damle ve arkadaşları daha da ileri olarak, IgVH gen mutasyon durumu, CD38 yüzey ifadenmesi ile klinik seyir arasında bağlantı bulmuşlardır(38). B-KLL'li vakaların mutasyonlu IgVH genleri ve düşük CD38 pozitif hücre sayısı olanların daha iyi klinik seyri olduğunu göstermişken, mutasyonu olmayan IgVH genlerinin klinik olarak yaşam süresini ve kemoterapiye yanıtı azalttığı gösterilmiştir. CD38, aktivasyon ve değişim bağımlı tek zincir tip II transmembran glikoproteinidir(73). Hücre fonksiyonları arasında hücre çoğalması ve yaşamı için sinyal iletimi vardır(71). Daha da ileri olarak, endotel hücrelerine selektin benzeri bağlanma ile adezyon molekülü gibi davranır(70). CD38 ifadenmesi, B hücre öncülleri, germinal merkez ve plazma hücrelerinde çok iken, çevre kanında ve tonsiller B hücrelerinde çok azdır. CD38'in KLL patofizyolojisindeki rolü halen bilinmemektedir. IgVH gen mutasyon durumunun aksine, CD38 in flow sitometrik ölçümü

kolaylıkla yapılabilmektedir ve B-KLL' li hastaların klinik seyirleri hakkında fikir vermektedir.

2.6.CD138

Syndecan-1 (CD138) bir transmembran heparan sülfat proteoglikandır, hücre-matriks ve hücre hücre ilişkilerinde önemli rol oynar. C138 B lenfositlerinde, belirli gelişim aşamalarında ortaya çıkar. Hematopetik hücrelerde syndecan-1, B lenfositlerinin sadece pre-B ve Ig yapan plazma hücrelerinde yapılır. Syndecan, B lenfositlerin dolaşıma geçmelerinden hemen önceki dönemde hücre yüzeyinden kaybolur. Dolaşan B lenfositlerin yüzeyinde syndecan-1 yoktur. B-Kronik Lenfositik Lösemi (B-KLL) hücrelerinin yüzey antijenik profiline bakıldığında zayıf monotipik immunglobulin (IgM) ve CD19, CD23, CD5 pozitifliği görülür. CD20, CD22, FMC7 ve CD11c zayıf pozitifdir veya yoktur. CD79b ve CD10 antijenleride negatiftir. Kronik Lenfositik Lösemide syndecan-1 ile ilgili araştırmalarda birbirinden farklı sonuçlar bildirilmiştir. Araştırma sonuçları KLL hastalarının kemik iliği lenfositlerinde CD138 varlığını göstermiştir. KLL hücrelerindeki beklenmedik bu bulgu syndecan-1'in KLL için bir tanı aracı olabileceğini düşündürür. KLL lenfositlerinde CD138 bulunmasının mekanizması ve fonksiyonel anlamı henüz kesin bilinmemektedir(69).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.FLOW SİTOMETRİ ANALİZİ

Flow sitometri, kantitatif tek hücre seviyesinde, hızlı ve çok parametrelili analiz imkanı sağlayan bir yöntemdir. Flow sitometrik analizde hücrelerin süspansiyon haline getirilmesi ve hücrelerin monoklonal antikor ile işaretlenmesi ana kuraldır. Hücrelerin izolasyonundan sonra bir veya daha fazla floresan bağlı antikorlar ile hücreler konjuge edilir. Problar genellikle yüzey antijenine veya hücre içi elemanlara spesifiktir.

Flow sitometride en az dört fotodedektör vardır. Forward Angle Light Scatter (FALS), Right Angle Light Scatter (RALS), yeşil floresan (FL1) ve kırmızı floresandı(FL2). FALS önden saçılımı sağlar ve hücrenin granülaritesini gösterir. FALS/RALS histogramı ile hücre süspansiyonundaki farklı popülasyonlar birbirinden ayrılabilir. Örnek geçirilirken seçilen popülasyondaki hücrelerin verdiği floresan ile hücre sayısı arasındaki ilişkiye göre yorum

yapılır. Çok çeşitli fotodedektörler kullanılarak kompleks hücre süspansiyonlarının multiparametrik analizi yapılabilmektedir. Flow sitometrik analiz için örnekler direkt veya indirekt metotlar kullanılarak işaretlenmektedir(16).

3.2.ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI

Çevre kanı, kemik iliği örnekleri heparin veya EDTA'lı tüplere alınabilirler. Bu tüpler oda ısısında saklandıklarında ortalama 24 saate dek örneklerde belirgin değişikliğe yol açmamaktadır.

Tüm immünofenotipleme örneklerinin ortam ısısında (17 – 25° C) taşınması gereklidir. Daha soğuk ya da daha sıcak ortamlarda örnek transportu hücre membranında değişikliklere yol açarak antijenlerin saptanma oranlarını etkilemektedir. İmmünofenotipleme örnekleri buzdolabında saklanmamalıdır.

Örnek hazırlama ve yıkama aşamalarında kullanılan tüm solüsyonların steril bidistile su ile hazırlanması, pH değerlerinin her gün ölçülerek 7,2 – 7,4 değerinde tutulması, tüm solüsyonların 0,2 mikronluk laboratuvar tipi filtrelerden geçirilerek kullanılması önemlidir.

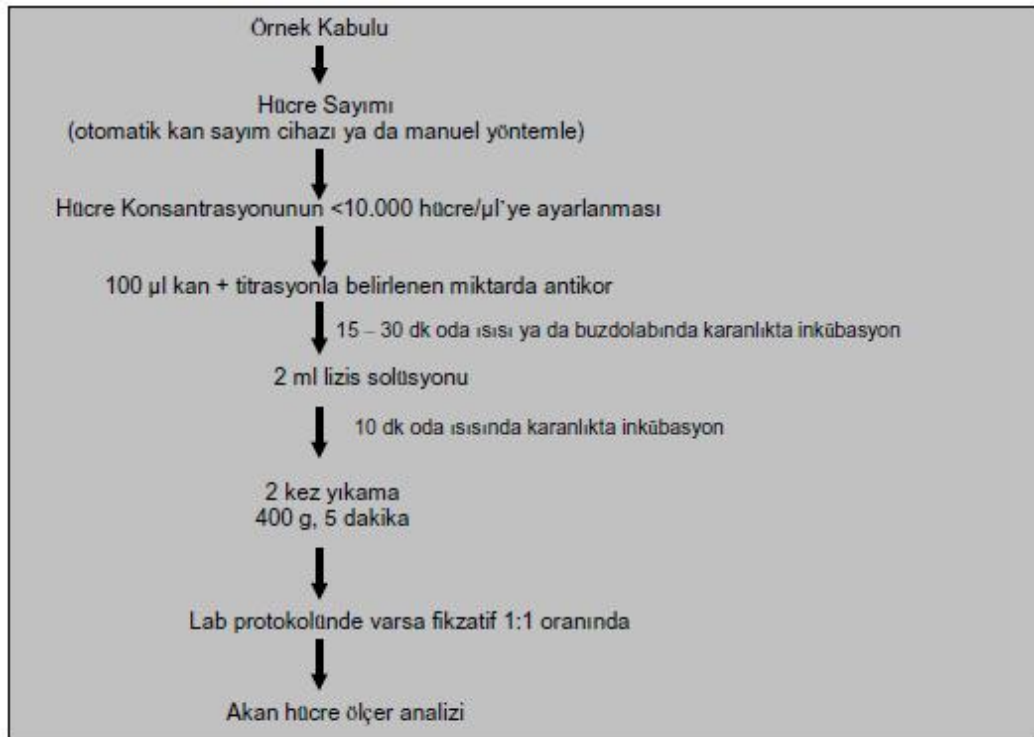
İmmünofenotipleme örneklerinin hazırlanmasında çevre kanı ve kemik iliği aspirasyonu örnekleri için tam kan lizis uygulaması standart hale gelmiş bulunmaktadır. Mono nükleer hücre süspansiyonu hazırlayarak çalışmak bazı hücrelerin yüzeyinden antijenik bağlanma bölgesinin kopmasına (CD8, CD56 vb.), hücrelerin bir bölümünün kaybedilmesine yol açtığı için giderek daha az kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Tüm akan hücre ölçek analizlerinde olduğu gibi lenfosit immünofenotipleme örneklerinde de hücre sayısının bilinmesi ve hazırlık aşamasında <10,000 hücre/µl olacak şekilde hücre konsantrasyonunun ayarlanması gerekir. Kalibrasyonu iyi yapılmış, günlük kalite kontrolleri düzenli olarak yapılan bir kan sayım sistemi ile kan sayımı yapılması hem konsantrasyonun ayarlanması hem de işaretli alandaki hücre oranının karşılaştırılabilmesi için veri sağlayacaktır. Günümüzde daha çok direkt boyama yöntemleri kullanılarak örnek hazırlanmaktadır.

Hazırlık aşamasında her laboratuvar çalışılan teste uygun olarak hazırlık yöntemi belirlemektedir. Son yıllarda “no wash/lyse” yöntemi olarak adlandırılan yıkama yapmadan örnek hazırlama yöntemi daha ideal bir yöntem olarak kabul edilmekte ise de

değişken floresan/protein oranları, non spesifik bağlanmaların tam anlamı ile bertaraf edilememesi nedeni ile pratikte, "lyse/wash" sistemi daha iyi sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. Bu amaç için kullanılmak üzere çok sayıda ticari kit bulunmaktadır, ancak laboratuvarların kendi lizis solüsyonlarını hazırlamaları (örneğin, NH_4Cl) hem daha ucuz hem de pratiktir. Lizis solüsyonlarının pH değeri 7,2 – 7,4 olmalıdır.

Örnek laboratuvara ulaştıktan sonra lenfosit immünofenotipleme için temel aşamalar aşağıdaki akış şemasında özetlenmiştir.

Lenfosit immünofenotipleme örnekleri analizi akış şeması



3.3.HASTA SEÇİMİ

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi hematoloji polikliniğine başvuran yeni tanı konmuş veya önceden tanı almış ancak ilaçsız takip edilen toplam 35 KLL hastası çalışmaya dahil edilmiştir. Tüm hastalara yeterli bilgi verildikten sonra onam formu alınarak, çalışmada kullanılmak üzere kan örnekleri için kemik iliği aspirasyonu yapılmıştır.

3.4.ZAP-70 İFADELENMESİ

100 µL lik tam kana 2 ml kadar BD FACS lizis solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. İki saat kadar oda sıcaklığında bekletildi. Santrifüj ettikten sonra üst süpernatant kısmı dökülüp, 1*PBS (fosfatla tampolanmış tuz) ile ve % 0,1 azid ile yıkandı. Anti ZAP-70 reaktifi tinden 20 µL eklenerek karıştırıldı. 30 dakika karanlık bir odada oda sıcaklığında bekletildi. Fosfat tampolanmış salin (PBS) ile ve % 0,1 azid ile yıkayıp üstüne %1 lik PBS 0,5 ml eklendikten sonra karıştırılarak analiz edildi.

3.5.CD38-CD138-CD56-CD16 YÜZEY MOLEKÜL İFADELENMESİ

1-12X75 mm lik polistenli flow tüplerine uygun miktarda flurokrom monoklonal antikorları eklenip (CD16-CD56-CD38-CD138) üzerine 100 µL tam kan ilave edildi.

2-Nazıkçe çevrilerek, karanlık odada 20-25 C° de 15-30 dakika bekletildi.

3- BD FACS lysing solüsyonundan 2 ml eklendi.

4-Nazıkçe çevrilerek, 10 dakika daha inkübe edildi.

5-300 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Çözeltinin üstünde kalan süpernatant kısmı atıldı.

6-2-3 ml BD Cell WASH solüsyonu (veya yıkama tamponu) eklendi. 200 devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra çözeltinin üstünde kalanı uzaklaştırıldı.

7-0.5 ml BD Cell WASH solüsyonundan eklenerek yavaşça karıştırıldı. 2-8 C° bekletildikten sonra 4 renkli flow sitometride analizi yapıldı.

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu tez çalışmasında elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS 16.0 paket programı kullanıldı. ZAP70, CD38, CD138, CD56, CD16 ile diğer değişkenler arasındaki karşılaştırmalar, Mann-whitney U ve Crosstabs ki-kare testi ile değerlendirildi. Korelasyon analizleri, Pearson testi kullanılarak yapıldı. Anlamlılık seviyesi olarak 0,05 alınmış olup p değerinin <0,05 olması durumunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtildi.

5.BULGULAR

Çalışmamıza 25'i erkek, 10'u kadın toplam 35 KLL hastası katılmıştır.

Kadınların median yaşı 72 (47-81), erkeklerin median yaşı 65 (45-85) idi.

Bu hastalardan 8'i yeni tanı, 27' si tedavisiz takipte olan hastalardı. Tedavisiz geçen süreleri median: 35 ay (9-61) şeklindeydi.

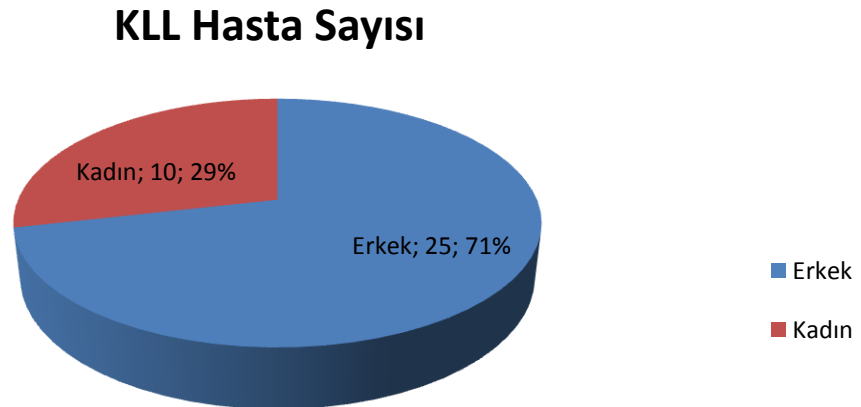
12 hasta Evre 0, 9 hasta Evre I, 5 hasta Evre II, 5 hasta Evre III, 4 hasta Evre IV olarak kaydedildi.

Çalışmaya katılan hastaların hepsi B hücre kökenliydi.

Bu çalışmada ZAP70, CD38 antijenik ifadenme için pozitiflik %20 ve üzeri olarak kabul edildi.

Cinsiyet	Sayı	Yaş Dağılımı(Yıl)	Yaş median (Yıl)
Kadın	10	47-81	72
Erkek	25	45-85	65
TOPLAM	35	45-85	66

Tablo 4: Çalışmaya Katılan KLL Hastalarının Cinsiyet ve Yaş Dağılımı



Grafik 1: Çalışmaya Katılan KLL Hastalarının Cinsiyet Dağılımı

Yaş (y) (Ortanca)	66 (45-85)
Cinsiyet	
Erkek	25
Kadın	10
Lökosit (Ortalama) 10 ³ /uL	42,57 (12,30-137,00)
Lenfosit (Ortalama) 10 ³ /uL	35,57 (8,90-130,00)
Hb (Ortalama) g/dL	12,80 (8,11-15,90)
Plt (Ortalama) 10 ³ /uL	192,81 (25-521)
LDH (Ortalama) u/L	197,40 (116-419)
Rai Evre	
0	12
I	9
II	5
III	5
IV	4
ZAP70 İfadelenmesi % (Ortalama)	
Negatif	6,65
Pozitif	35,20
CD38 İfadelenmesi % (Ortalama)	
Negatif	4,62
Pozitif	38,12
CD138 İfadelenmesi % (Ortalama)	0,19 (0,00-1,00)
CD56 İfadelenmesi % (Ortalama)	2,91 (0,40-12,00)
CD16 İfadelenmesi % (Ortalama)	1,53 (0,04-5,56)

Tablo 5: Çalışmaya Katılan KLL Hastalarının Klinik Özellikleri

Çalışmamızda Evre 0 olan 12 hasta vardı. Bu hastaların 2 si yeni tanı, 10 hasta ise median 32 ay (21-47) tedavisiz takipte olan hastalardı. İki hastada ZAP70 antijenik ifadelenmesi yüksek bulundu. Yeni tanı alan hastalarda ZAP70 ifadelenmesi düşüktü. Hastaların hepsinde CD38, CD138, CD56, CD16 ifadelenmesi düzeyleri düşük olarak tespit edildi.

Evre I olan 9 hastanın 3'ü yeni tanı, 6'sı median 37.5ay (9-60) takipli olan hastalardı. Bir hastada CD38 antijenik ifadelenmesin yüksekti. 9 hastada ZAP70 ve çalışılan diğer parametlerin düşük olduğu görüldü.

Evre II olan 5 hastanın hepsinde median 46 ay (13-61ay) takip edilen hastalardı. Bu hastalardan birinde ZAP70 antijenik ifadelenmesi yüksekti.

Evre III olan 5 hastanın 2'si yeni tanı 3'ü median 31ay (18-51 ay) takipli hastalardı. Tüm hastalarda ZAP70 ve çalışılan hücre yüzey antijenlerinin düzeyleri düşük olarak bulundu.

Evre IV olarak tespit edilen 4 hastadan biri yeni tanı 3'ü median 41ay(48-14ay) takipli hastalardı. Takipte olan bu 3 hastanın ortalama progresyonsuz yaşam süresi 12ay (10-36ay) dı. Evre IV olarak tespit edilen bu hastalardan 2 sinde hem ZAP70 hemde CD38 ifadenme düzeyleri birlikte yüksek bulundu.

Tanı sırasında evre III olan ve çalışmaya dahil edilen 2 hastaya, tedavisiz takipte iken evre 0'dan evre III' ilerleyen ve semptomatik hale gelen 3 hastaya [tedavisiz sağkalım süreleri median: 19 ay (15-26)] tedavi başlandı. Bu 3 hastanın 2'sinin dosya verileri incelendiğinde tanı anındaki CD38 ifadenmesinin yüksek olduğu izlendi.

ZAP70 antijenik ifadenmesi pozitif olan 5 hastanın median yaşı: 72 (49-81), Erkek/Kadın: 2/3 iken negatif 30 hastanın median yaşı 66 (45-85), Erkek/Kadın: 23/7 şeklindeydi. İki grup arasında yaş ve cinsiyet açısından fark saptanmadı (p>0,05).

Çalışmaya alınan 35 hastadan, 26 hasta (%74,3) Rai Evresi 0-I veya II, 9 hasta (%25,7) Evre III- Evre IV idi. Evre III ve Evre IV olan 9 hastanın 2'sinde ZAP70 antijenik ifadenmesi pozitif (%22,2), 7'sinde ZAP70 antijenik ifadenmesi negatif (%77,8).

	ZAP70 POZİTİF n=5	ZAP70 NEGATİF n=30	p Değeri
Yaş	72 (49-81)	66 (45-85)	,94
Lökosit 10³/uL	28,07	44,98	,23
Lenfosit 10³/uL	23,68	37,54	,34
Hb g/dL	12,34	12,87	,45
Plt 10³/uL	210,10	189,93	,96
LDH u/L	208,60	195,53	,33
Rai Evre III-IV	2	7	,43

Tablo 6: ZAP70 Pozitif / Negatif Grupların Kan Sayımı, LDH, Rai Evresine Göre Dağılımı

CD38 ifadelenmesi 3 hastada [median yaşı: 69 (56-74) (Erkek/Kadın: 3/0)] pozitif, 32 hastada [median yaşı 66 (45-85)] negatif olarak tesbit edildi.

CD 38 pozitif olan 3 hastanın 1'i, ileri evre iken, 2'si erken evreydi.

CD38 pozitif ve negatif gruplar arasında yaş, cinsiyet arasından istatistiksel fark saptanmadı ($p>0,05$).

	CD38 POZİTİF n=3	CD38 NEGATİF n=22	p Değeri
Yaş	69 (56-74)	66 (45-85)	,10
Lökosit 10³/uL	27,64	43,97	,28
Lenfosit 10³/uL	21,94	36,85	,34
Hb g/dL	15,30	12,57	,01
Plt 10³/uL	131,67	198,55	,44
LDH u/L	215,00	195,75	,25
Rai Evre III-IV	1	8	,75

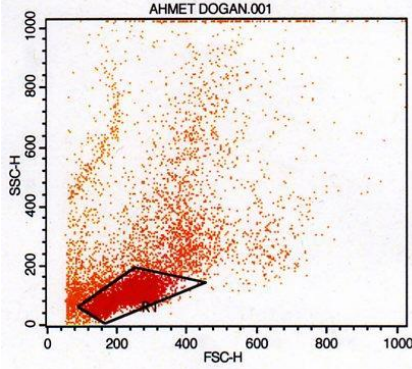
Tablo 7: CD38 Pozitif / Negatif Grupların Kan Sayımı, LDH, Rai Evresine Göre Dağılımı

CD138 çalışmaya katılan tüm hastalarda çok düşük düzeyde eksprese edildi, bundan dolayı istatistiksel çalışmaya dahil edilmedi.

CD56 çalışmaya katılan 35 hastanın 6 'sında % 5 'in üzerinde (3'ünde % 10) eksprese edildi. Hastaların yine 3'ünde eş zamanlı ZAP70 antijenik ifadelenme pozitifdi. Bu 6 hastanın 5 'inde CD38 negatif 1'inde CD38 pozitifdi. Olgu sayısının az olması nedeni ile aralarında istatistiksel ilişki kurulamadı. CD56 'nın % 5 'in altında ifadelenme gösteren hastalarla, %5 'in üzerinde ifadelenme gösteren hastalar karşılaştırıldığında yaş, cinsiyet, ve laboratuvar parametleri açısından aralarında istatistiksel anlamlı fark bulunamadı.

CD16 ifadelenme yüzdesi en düşük 0,11 ile en yüksek 5,56 olarak tespit edildi. CD16 'yı % 5,56 eksprese eden 2 hastada Rai evre 0 idi. Her ikisinde de ZAP70 pozitif CD38 negatif olarak görüldü.

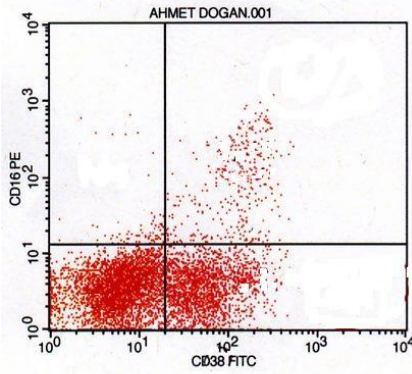
Institution : KONYA UNIVERSITESI
Director : PROF.DR.ISMAIL REISLI
Operator : BIYOLOG REYHAN KARA



Region Statistics

File: AHMET DOGAN.001 Sample ID: AHMET DOGAN
Patient ID: Acquisition Date: 22-Feb-12
Gate: No Gate

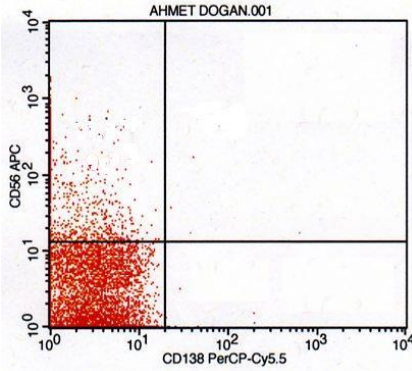
Region	% Gated
R1	62.11



Quadrant Statistics

File: AHMET DOGAN.001 Sample ID: AHMET DOGAN
Patient ID: Acquisition Date: 22-Feb-12
Gate: G1

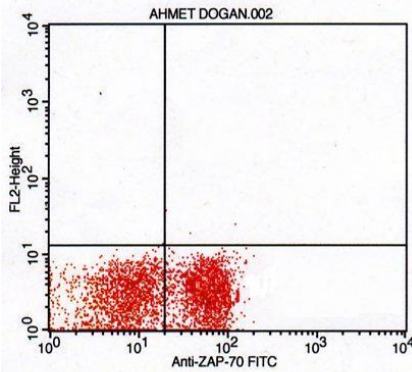
Quad	% Gated
UL	1.40
UR	5.15
LL	59.97
LR	33.47



Quadrant Statistics

File: AHMET DOGAN.001 Sample ID: AHMET DOGAN
Patient ID: Acquisition Date: 22-Feb-12
Gate: G1

Quad	% Gated
UL	11.87
UR	0.05
LL	87.92
LR	0.16



Quadrant Statistics

File: AHMET DOGAN.002 Sample ID: AHMET DOGAN
Patient ID: Acquisition Date: 22-Feb-12
Gate: G1

Quad	% Gated
UL	0.03
UR	0.08
LL	50.67
LR	49.22

Yrd. Doç. Dr. Sevgi KELES
Konya Meram Tıp Fak. Hast.
Çocuk Allergi ve İmmünoloji Uzm.
Dipl. No: 833665

TETKIKI YAPAN
BIYOLOG REYHAN KARA

Page

ZAP70 ve CD38 'in % 20 'nin üzerinde eksprese edildiği KLL hastalarında Flow Stometrik Analiz Sonuçları

6.TARTIŞMA VE SONUÇ

Kronik lenfositer lösemi batı toplumlarında en sık görülen lösemi tipidir ve tüm lösemilerin %20-30'unu oluşturur(4). Erkeklerde kadınlardan iki kat fazla görülmektedir. Hastalığın fenotipi çoğunlukla (%95) B hücreli -KLL şeklindedir. Hastalık ileri yaşlarda ortaya çıkmakla birlikte son yıllarda genç yaşlarda (%7-24 'ünün 55 yaş altı) görülme olasılığı artmıştır (6). Kronik lenfositer lösemi tanılı hastaların en önemli özelliği hastalığın seyrinin son derece değişken olmasıdır. Tüm dünyada kabul gören, gerek Binet ve gerekse Rai skorlama sistemleri tedavi kararı vermede hali hazırda ilk gözetilen kriterler olmasına karşın, klinik seyrin belirlenmesinde her zaman güvenilir birer dayanak olmadıkları görüşü gittikçe taraftar bulmaktadır. Erken evre olarak başvuran olguların yaklaşık %30-40 'ı ileri evrelere geçebilmekte ve hastalık nedeniyle yaşamlarını yitirebilmektedir. Buna karşılık tanı sırasında ileri evre olmalarına karşın bir grup hasta yavaş seyir ve uzun yaşam süresine sahip olabilmektedir(66). Güncel evreleme sistemleri bu olguların ayırımında yetersiz kaldığından klinisyenlerin hastalarda, özellikle genç olanlarda, nasıl bir yol izleyeceği sorusu halen cevabını bulmuş değildir. Bu nedenle hastalığın nasıl bir seyir göstereceği konusunda yeni prognostik belirteçlere ihtiyaç olduğu görülmüş ve bununla ilgili yeni çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda lösemik hücrelerde IgVH mutasyon durumu, ZAP70 varlığı, CD38 ifadelenme düzeyinin bağımsız birer prognostik faktör olabilecekleri gösterilmiştir.

KLL de klinik seyrin en iyi belirleyicilerinden biri olarak IgVH mutasyonu olduğunu bildiren çalışmalar vardır. IgVH mutasyonu olan olgularda, mutasyonu olmayan olgulara göre klinik gidişin daha iyi olduğu bildirilmektedir(38). Orchard ve arkadaşlarının 167 KLL hastası ile yaptıkları çalışmada akım sitometrik yöntemle ölçülen ZAP70 ifadelenmesinin KLL' de güvenilir bir belirteç olabileceği gösterilmiştir (51). Yine Crespo ve arkadaşları tarafından 56 KLL hastasında akım sitometri yöntemiyle saptadıkları ZAP70 ifadelenmesini, IgVH mutasyon durumuyla karşılaştırdıkları çalışmada; ZAP70'in yüksek oranları ile IgVH geninde mutasyon olmaması arasında pozitif bir ilişkili olduğu gösterilmiştir(49). Bizim çalışmamızda sadece 5 hastada ZAP 70 ifadelenmesi pozitif olarak bulunmuş olup sayı

yetersiz olduğu için istatistik yapılamamıştır. Ancak bu çalışmada yer alan hastaların çoğunluğunun [26 hasta (%73) nın] erken evre olduğu göz önüne alındığında elde edilen sonucun gerçekte çok anlamlı olduğu düşünülmekte ve literatürle paralel olduğu görülmektedir.

Yine çalışmadaki erken evre olarak belirlenen 26 hastanın 23'ünde ZAP70 ifadenmesi nin düşük ve tedavisiz geçen sürelerinin uzun [ortanca 35 ay (9-61 ay)] olarak bulunması (52) birçok çalışma sonucu ile uyumlu görünmekteydi.

Dürin ve arkadaşları tarafından 133 B-KLL'li hastada yapılan çalışmada, CD38 pozitifliğinin kötü bir klinik seyre, daha ileri evreye, erken tedavi gereksinimine ve kısa yaşam süresine işaret ettiği gösterilmiştir(92). Hablin ve arkadaşları ise 145 B-KLL'li hastada yaptıkları çalışmada, 41 olguda CD38 pozitifliğini tespit etmişler ve bu hastaları altı aydan dokuz yıla kadar takip ettiklerinde 8 hastada CD38 pozitifliğinin arttığını, 2'sinde azaldığını, 31'inde stabil kaldığını göstermişlerdir. Sonuç olarak, CD38 pozitifliğinin bağımsız bir prognostik belirteç olabileceği her iki çalışmada da saptanmıştır (48). Bizim çalışmamızda sadece 35 hastanın 3'ünde CD38 ifadenmesi yüksek olarak bulunmuştur. CD38 ifadenmesi göstermeyen 32 hastanın 24 'ü (%75) erken evreydi. Çalışmaya alınan tüm erken evre 26 hastadan ise sadece ikisinde CD38 ifadenme düzeyi %20 nin üzerindeydi. Sayılarımız istatistik yapmak için uygun olmamakla birlikte gerçekte sonucumuz literatürdeki bilgilere uygun olarak görünmekteydi. Ancak bu çalışmada, hastaların uzun süreli takipleri yapılamaması nedeni ile CD38 ifadenmesi ile hastalığın seyri ilişkilendirilememiştir.

Del Principe ve arkadaşlarının çalışmasında, ZAP70 pozitifliği ile CD38 ifadenmesi %30'un üzerinde olan hastalar arasında önemli ilişki gözlenmiştir(84). During ve arkadaşlarının çalışmasında CD38 eşik değerini % 20 olarak kabul edilmiş ve benzer ilişki saptamıştır(50). Çalışmamızda CD38 ifadenmesinin eşik değeri olarak % 20 alındığında, ZAP70 (+) olan 5 hastanın sadece 1'inde CD38(+) olduğu görüldü. Beklendiği gibi ZAP70 pozitif hastalarda CD38 pozitifliği yüksek değildi. ZAP70 pozitif ve negatif gruplar arasında CD38 pozitifliği açısından aralarında anlamlı fark saptanmadı. CD38 ve ZAP70 pozitif değerler arasındaki bu uyumsuzluk hasta sayısının az olması dışında CD38 ifadenme düzeyinin hastalığın seyri sırasında değişken olabileceğinden ve çalışmada pozitif sınırı

olarak kabul edilen %20 ifadenme düzeyinin yüksek eşik değeri olmasından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür.

B hücreli KLL hastalarının kliniği, lösemik lenfositlerin biyolojik özelliklerinin yanında bazı sitokinlerin serum düzeylerine de bağlıdır. Bu sitokinlerden, CD138 (Syndecans-1) hücre adezyonunda görev alan, hücre büyüme ve farklılaşmasını kontrol eden, hücre-hücre/hücre-ekstraselüler matris etkileşimlerini düzenleyen önemli bir proteindir. Normal şartlar altında, olgun plazma hücrelerinde ve erken pre-B hücrelerinde (+) olan CD138 'in son zamanlarda, bazı yayınlarda, lösemi/lenfoma, B- hücreli akut lenfoblastik durumlarda reaktivitesi bildirilmiştir(69). Dariusz Wolowiec ve arkadaşlarının B-KLL hastalarında sCD138 ve bazı sitokinlerin (VEGF,bFGF,endostatin) serum düzeyleri ile hastalık saldırganlık derecesini inceledikleri araştırmada: bFGF ve sCD138 serum konsantrasyonunun tüm B-KLL hastalarında yaş olarak eşleştirilmiş sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. İlerleyici hastalığı olanlarda bFGF anlamlı olarak daha yüksek çıkarken, stabil hastalığı olanlarda sCD138 düzeyi daha düşük seviyelerde olduğu görülmüştür. Yüksek sCD138 seviyesine sahip hastalara kıyasla, lenfosit iki katına çıkma olasılığı, sCD138 seviyesi medyan değerinin altında olan grupta daha düşük bulunmuştur(95).

Çalışmamıza katılan 35 B-KLL hastalarının biri hariç hepsinde sıfırın altında CD138 ifadenmesi saptanmıştır. Bunun nedeni plazma hücresi ve pre-B lenfositleri tarafından eksprese edilen CD138 'in kabul edilen aksine kemik iliğindeki olgun B lenfositleri tarafından düşük seviyelerde salınmakta olduğunu düşündürmektedir.

Doğal immünitenin elamanı olan doğal öldürücü (Natural Killer –NK) hücreler kemik iliği kökenli, büyük granüllü lenfositlerdir (94). B-KLL hastalarında, NK hücreleri fenotipik ve fonksiyonel değişikliklere uğramıştır. Bundan dolayı B-KLL hastalarının bir kısmında periferik kan örneklerinden yapılan çalışmalarda NK aktivitesi düşük ve bozulmuş olarak bulunmaktadır (59). Çalışmamıza katılan hastaların hepsinin B hücreli KLL olması, NK hücreli KLL hastamızın hiç olmamasından dolayı Kİ aspirasyonu örneklerimizin hepsinde CD56 ve CD16 ifadenmesi %20 'nin altında tespit edilmiştir. Çalışmalarda NK hücrelerinin periferik kanda çalışılması, bu çalışmada ise Kİ aspirasyon örneklerinin kullanılması ve düşük CD56 ve CD16 ifadenmelerinin bulunmasını görece açıklamaktadır.

Çalışmamızda CD56-CD16 ifadelenmesinin düşük tespit edilmesinin bir sebebi de, B-KLL hastalarında NK hücre sayı ve fonksiyonundaki azalma olabilir.

Sonuç olarak, KLL hastalarında hastalığın seyrini belirlemede ZAP70, CD38, CD138, CD56, CD16 antijenik ifadelenmelerin kullanılabilceğine dair birçok çalışma bulunmaktadır. Özellikle yüksek orandaki ifadelenmelerin ileri evre hastalık, erken dönemde tedavi ihtiyacının belirmesi ve tedaviye yanıtızsızlık ile birlikteliğinin bildirilmesi, bu belirteçleri giderek ilgi odağı haline getirmiştir. Bizim çalışmamızdaki veriler istatistiksel değerlendirme için uygun olmamakla birlikte hastaların yüksek çoğunluğunun erken evre ve/veya tedavisiz izlemde olması, gerçekte sonuçların çok anlamlı olduğunu, hem klasik hemde literatür bilgilerimiz ile örtüştüğüne işaret etmektedir. Ancak sonuçlarımızın net bir anlamlılık kazanması için daha fazla hasta katılımına ve da uzun takip sürelerine ihtiyaç vardır.

7. ÖZET

Amaç: Kronik Lenfositler Lösemi(KLL) kan, kemik iliği, lenf nodu ve dalakta proliferasyon özelliği olmayan olgun lenfositlerin artışı ile ortaya çıkan, farklı klinik seyirler gösterebilen bir hastalıktır. Çoğu B lenfosit kökenlidir, %1'inden daha azı T lenfositlerinden kaynaklanmaktadır. İleri yaş hastalığı olmasına rağmen olguların %7-24 'ünün 55 yaşın altında oldukları bildirilmektedir.

Rai ve Binet tarafından oluşturulan sınıflamalar bu gün için KLL 'de kullanılan güncel evreleme sistemleridir. Bu sistemler evre ve sağ kalım süresi arasında anlamlı bir ilişki göstermesine rağmen bazı eksik tarafları mevcuttur. Herhangi bir evrede olan hastalar arasından, hastalığı progresif olabileceklerle yavaş seyir gösterecekler arasındaki ayrımı yapmada her iki evreleme sistemi de yetersiz kalmıştır. Özellikle erken evre olan vakalarda prognozu belirlemek için yeni serum belirteçlerine ihtiyaç doğmuş, buradan yola çıkarak yapılan araştırmalarda immunglobulin ağır zincir değişken bölgesindeki(IgVH) somatik mutasyonların varlığı çok değerli bir prognostik faktör olarak saptanmıştır. IgVH mutasyonu olan hastalar, olmayanlara göre daha iyi bir klinik gidiş gösterdikleri tespit edilmiştir. Kronik lenfositler lösemi hücrelerinde, zeta ilişkili proteinin (ZAP70) ve CD38 ifadenmesinin gösterilmesinden sonra bu belirteçlerin de prognozu belirlemede kullanılabileceği yönünde yeni araştırmalar yapılmıştır. Birçok kanserde kötü prognostik belirteç olarak gösterilen CD138 'in KLL 'de iyi klinik gidişin habercisi olabileceği öne sürülmüştür. KLL hastalarının periferik kanlarında CD3(+) Natural Killer benzeri hücrelerin gösterilmesi bu hastalarda azalmış sitotoksite nedeni olarak gösterilmiştir Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızın amacı; yeni tanı almış ve tedavi almayan KLL hastalarında ZAP70, CD38, CD138, CD16 ve CD56 ifadenme düzeylerinin evre ve prognoza etkilerinin incelenmesidir.

Gereç ve yöntem: Bu çalışmada ucuz ve kolay uygulanabilir bir metod olan flow sitometri yöntemi ile KLL hastaların KI aspirasyonlarından elde edilen kan örneklerinde

ZAP70, CD38, CD138, CD56, CD16 ifadelenme düzeyleri ölçüldü. %20'nin üzeri ifadelenme değerleri pozitif olarak kabul edildi.

Bulgular: ZAP70 ifadelenmesi, çalışmaya alınan 35 hastanın 5'inde pozitif olarak saptandı. Düşük ZAP70 ifadelenmesi gösteren hastaların erken evre vakalar olduğu ve bu hastaların progresyonsuz sağ kalımlarının uzun olduğu görüldü. CD38 ifadelenmesi, 3 hastada pozitif olarak saptandı. CD38 ifadelenmesi düşük hastaların da daha çok erken evre oldukları ve progresyonsuz sağ kalımın diğerlerinden daha uzun olduğu tespit edildi. Olgularda ZAP70 ifadelenmesi ile CD38 ifadelenme düzeyi karşılaştırıldığında sadece bir olguda aynı anda her ikisinde pozitif olduğu görüldü. CD38 ile ZAP70 pozitifliği arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

CD138, CD56, CD16 tüm hastalarda düşük düzeyde ifadelendiği görüldü. Fakat CD56'nın %5 'in üzerinde ifadelendiği 6 hastanın 3 'ünde ZAP70 'in (+) olduğu görüldü.

Sonuç: KLL hastalarında klinik seyrin belirlenmesinde ZAP70-CD38-CD138-CD56-CD16'nın antijenik ifadelenme düzeyleri bir belirteç olarak kullanılabilir. Bu belirteçlerin serum düzeyleri ile ileri hastalık, erken tedavi ihtiyacı, tedaviye direnç arasında ilişki vardır. Erken evredeki ve tedavisiz sağ kalımın uzun olduğu hastalarda bu belirteçlerin düşük düzeyde ifadelendiği tespit edilmiştir. KLL'de hücre yüzey antijenlerinin evre ve prognoza etkilerini daha iyi anlayabilmek için; daha fazla hasta sayısını, sağlıklı kontrol gruplarıyla karşılaştırmalı olarak, uzun süreli klinik takiplerinin yapılması gerekmektedir.

8.ABSTRACT

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is characterized by increased number of mature non-proliferative lymphocytes in blood stream, bone marrow, lymph node and spleen with different clinical course. Family history is an important risk factor for CLL. It is suggested that the malignant transformation of B cells play an important role for CLL development while less than 1 % is caused by T lymphocytes. Although most CLL patients are elderly, 10% of them are younger than 50.

In CLL patients, Rai and Binet classification systems are established for determination of the necessity of treatment and prediction of survival. However, the prognostic value of these classifications is limited in early staged patients. The presence IgVH somatic mutation in the heavy chain variable region of immunoglobulin has been found a valuable prognostic factor. Patients with IgVH mutation shows a better clinical course than those without. After determination of the relationship between expression of zeta-associated protein (ZAP70) and IgVH mutation in CLL cells, a lot of research has been made for the usage of expression of ZAP70 rather than IgVH mutation of an expensive technique.

Finally, CD38 and CD138 are suggested to be important prognostic markers in some studies.

In this study, ZAP70, CD38, CD138, CD56, CD16 expression levels were measured from bone marrow aspirations of patients with CLL by flow cytometry of an inexpensive and easy method. Expression levels over 20% were considered as positive. ZAP70 expression was positive in 5 of 35 investigated patients. There was no significant correlation between ZAP 70 expression and patients' age, sex, hemoglobin and LDH levels, leukocyte, lymphocyte and platelet counts.

CD38 expression was positive in 3 of 35 investigated patients. There was no significant correlation between CD38 expression and patients' age, sex, hemoglobin and LDH levels,

leukocyte, lymphocyte and platelet counts. In only one patient, both ZAP70 and CD38 expressions were positive. There was no significant correlation between ZAP70 with CD38 positivity.

CD138, CD56, CD16 was expressed at low levels in all patients.

For demonstrating the relation between the expression of ZAP70 and CD38 over 20% and the prognosis of CLL patients, long-term observational studies are needed.

Long-term clinical observational studies with control groups should be made for understanding the effects of surface antigens in staging and prognosis of CLL.

9.KAYNAKLAR

1. Rich RR. The human immune response. *Clinical Immunology, Principles and Practice*. Editörler: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM. Mosby Elsevier, ABD, say. 3 – 17, 2008.
2. Landay A, Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi JV. Application of flow cytometry to the study of HIV infection. *AIDS* 4:479-497, 1990.
3. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Eng J Med*; 352 (8):804-815, 2005
4. Ghia P, Ferreri AM, Galigaris-Cappio F. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007.
5. Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, Botteman MF, Pashos CL. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Cancer Care (Engl)*; 13 (3):279-87, 2004.
6. Call TG, Phyliky RL, Noel P, Habermann TM, Beard CM, O’Fallon WM, Kurland LT. Incidence of chronic lymphocytic leukemia in Olmsted County, Minnesota, 1935 through 1989, with emphasis on changes in initial stage at diagnosis. *Mayo Clin Proc.*; 69(4): 323-8,1994.
7. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O’Brien S, Rai KR. National Cancer Institute-Sponsored Working Group Guidelines for Chronic Lymphocytic Leukemia: Revised Guidelines for Diagnosis and Treatment. *Blood*; 87 (12): 4990-4997, 1996.
8. Schade U, Bock O, Vornhusen S, Jager A, Büsche G, Lehmann U, Kreipe H. Bone marrow infiltration pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia is related to immunoglobulin heavy-chain variable region mutation status and expression of 70-kd zeta-associated protein (ZAP-70). *Hum Pathol*; 37 (9): 1153-1161, 2006.
9. Zent CS, Call TG, Hogan WJ, Shanafelt TD & Kay NE. Update on risk-stratified management for chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*; 47(9): 1738-1746, 2006.
10. Oscier D, Fegan C, Hillmen P, Illidge T, Johnson S, Maguire P, Matutes E, Milligan D, Guidelines Working Group of the UK CLL Forum British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*; 125 (3): 294-317, 2004.
11. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*; 163-83, 2004.
12. Dighiero G. An attempt to explain disordered immunity and hypogammaglobulinemia in BCLL. *Nouv Rev Fr Hematol*; 30 (5-6): 283-288, 1988.

- 13.** Hamblin TJ, Oscier DG, Young BJ. Autoimmunity in chronic lymphocytic leukaemia. *J Clin Pathol*; 39 (7): 713-716, 1986.
- 14.** Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical Staging of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*; 46 (2): 219-34,1975.
- 15.** Rai KR, Han T. Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*; 4 (2): 447-456, 1990.
- 16.** Deniz G, Yilmaz MT, Yillar G. Flow sitometri ve tipta kullanımı. 2004; 1-11
- 17.** Hus I, Podhorecka M, Bojarska-Junak A, Rolinski J, Schmitt M, Sieklucka M, Wasik-Szczepanek E, Dmoszynska A. The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol*;17 (4): 683-690, 2006.
- 18.** Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang G, Piguët H, Goasguen J, Vaugier G, Porton G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbès S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48 (1); 198-206,1981.
- 19.** Hamblin TJ. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*; 20 (3): 455-468, 2007.
- 20.** Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patient with CLL. *Blood* ; 103(4),1202-1210,2004.
- 21.** Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*; 60 (11):2712-2716, 1987.
- 22.** Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Vinolos N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol*; 62 (3):567-575, 1986.
- 23.** Magnac C, Porcher R, Davi F, Nataf J, Payelle-Brogard B, Tang RP, Oppezso P, Levy V, Dighiero G, Ajchenbaum-Cymbalista F. Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL Leukemia; 17 (1): 133-137, 2003.
- 24.** Rozman C, Montserrat E, Rodriguez-Fernandez JM, Ayats R, Vallespi T, Parody R, Rios A, Prados D, Morey M, Gomis F, Alcalá A, Gutierrez M, Maldonado J, Gonzalez C, Giralt M, Hernandez-Nieto L, Cabrera A, Fernandez-Ranada JM. Bone Marrow Histologic Pattern- The Best Single Prognostic Parameter in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Multivariate Survival Analysis of 329 Cases. *Blood*; 64 (3):642-648, 1984.
- 25.** Rozman C, Hernandez-Nieto L, Montserrat E, Bragues R. Prognostic significance of bonemarrow patterns in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol*; 47(4); 529-537, 1981.

- 26.** Lipshutz MD, Mir R, Rai KR, Sawitsky A. Bone marrow biopsy and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 46 (6): 1422-1427, 1980.
- 27.** Molica S, Levato D, Cascavilla N, Levato L, Musto P. Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and κ_2 -microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*; 62 (2): 117-122, 1999.
- 28.** Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies *Haematologica*; 90 (3); 391-399, 2005.
- 29.** Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, Ostwald M, Busch R, Kuhn-Hallek I, Thiel E, Emmerich B. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 93 (5): 1732-1737, 1999.
- 30.** Pan L, Beveley PCL & Isaacson PG. Lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes and proliferative activity of lymphoid cells-an immunocytochemical study. *Clin Exp Immunol*; 86 (2), 240-245, 1991.
- 31.** Bouafia F, Draï J, Bienvenu J, Thieblemont C, Espinouse D, Salles G, Coiffier B. Proliferative and prognostic values of serum LDH isoenzymes in patients with haematopoietic malignancies. *Bull Cancer*; 91(7-8) : E229-40, 2004.
- 32.** Rambotti P, Davis S. Lactic Dehydrogenase in Normal and Leukemia Lymphocyte Subpopulations: Evidence for the Presence of Abnormal T Cells and B cells in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*; 57 (2), 324-327, 1981.
- 33.** Weinberg JB, Volkhemier AD, Chen Y, Beasley BE, Jiang N, Lanasa MC, Friedman D, Vaccaro G, Rehder CW, Decastro CM, Rizzieri DA, Diehl LF, Gockerman JP, Moore JO, Goodman BK, Levesque MC. Clinical and molecular predictors of disease severity and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*; [Epub ahead of print], 2007.
- 34.** Sarfati M, Chevret S, Chastang C, Biron G, Stryckmans P, Delespesse G, Binet JL, Merle-Beral H, Bron D. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 88 (11): 4259-4264, 1996.
- 35.** Karhu R, Tobin G, Thunberg U, Vilpo L, Sundström C, Knuutila S, Rosenquist R, Vilpo J. More extensive genetic alterations in unmutated than in hypermutated cases of chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*; 37 (4): 417-420, 2003.
- 36.** Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*; 194 (11): 1639-47, 2001.

- 37.** Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai K, Rassenti LZ, Kipps TJ, Dighiero G, Schroeder HW Jr, Ferrarini M, Chiorazzi N. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest*; 102 (8):1515-1525, 1998.
- 38.** Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*; 94 (6): 1840-1847, 1999.
- 39.** Hamblin TJ, Davis Z, Gardner A, Oscier D, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 94 (6):1848-1854, 1999.
- 40.** Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 100 (4); 1410-1416, 2002.
- 41.** Hayat A, O'Brien D, O'Rourke P, McGuckin S, Fitzgerald T, Conneally E, Browne PV, McCann SR, Lawler MP, Vandenberghe E. CD38 expression level and pattern of expression remains a reliable and robust marker of progressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*; 47 (11): 2371-2379, 2006.
- 42.** Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Levey RH, Schlossman SF. Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 77 (3): 1588-1592, 1980.
- 43.** Deaglio S, Dianzani U, Horenstein AL, Fernandez JE, van Kooten C, Bragardo M, Funaro A, Garbarino G, Di Virgillio F, Banchereau J, Malavasi F. Human CD38 ligand. A 120-KD A protein predominantly expressed on endothelial cells. *J Immunol*; 156(2): 727-734, 1996.
- 44.** Kato I, Takasawa S, Akabane A, Tanaka O, Abe H, Takamura T, Suzuki Y, Nata K, Yonekura H, Yoshimoto T, Okamoto H. Regulatory role of CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase) in insulin secretion by glucose in pancreatic beta cells. Enhanced insulin secretion in CD38-expressing transgenic mice. *J Biol Chem*; 270 (50):30045-30050, 1995.
- 45.** Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, Lerner S, Kantarjian HM, Albitar M. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 98 (1): 181-186, 2001.
- 46.** Funaro A, Spagnoli GC, Ausiello CM, Alessio M, Roggero S, Delia D, Zaccolo M, Malavasi F. Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation. *J Immunol*; 145 (8): 2390-2396, 1990.

- 47.** Deaglio S, Capobianco A, Bergui L, Dürig J, Morabito F, Dührsen U, Malavasi F. CD38 is signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*; 102 (6): 2146-2155,2003.
- 48.** Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*; 99 (3): 1023-1029, 2002.
- 49.** Crespo M, Bosch F, Villomor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marce S, Lopez-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulinvariable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*; 348 (18): 1764-75, 2003.
- 50.** Patel DV, Rai KR. Chronic Lymphocytic Leukemia. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al(eds): *Hematology basic principles and practice*, Elsevier, USA, 2005; 1437-154.
- 51.** Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, Hamblin TJ, Staudt LM, Oscier DG. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet*, 363 (9403): 105-111, 2004.
- 52.** Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberg DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70 Compared with Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Mutation Status as a Predictor of Disease Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*; 351 (9): 893-901. 2004.
- 53.** Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*; 343 (26):1910-1916, 2000.
- 54.** Glassman A, Hayes KJ. The value of fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*; 158 (1),88-91, 2005.
- 55.** Mehes G. Chromosome Abnormalities with Prognostic Impact in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Pathol Oncol Res*; 11 (4):205-210, 2005.
- 56.** Stankovic T, Hubank M, Cronin D, Stewart GS, Fletcher D, Bignell CR, Alvi AJ, Austen B, Weston vJ, Fegan C, Byrd PJ, Moss PA, Taylor AM. Microarray analysis reveals that TP53- and ATM-mutant B-CLLs share a defect in activating proapoptotic responses after DNA damage but are distinguished by major differences in activating prosurvival responses. *Blood*;103 (1): 291-300, 2004.
- 57.** Ripolles L, Ortega M, Ortuno F, Gonzalez A, Losada J, Ojanguren J, Soler JA, Bergua J, Coll MD, Caballin MR Genetic abnormalities and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*; 171 (1): 57-64. 2006.

- 58.** Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R, De Angeli C, Veronese A, Cavazzini E, Bardi A, Roberti MG, Tammiso E, Agostini P, Ciccone M, Della Porta M, Tieghi a, Cavazzini L, Negrini M, Castoldi G. CLL with 6q-shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia*; 18 (3): 476-483, 2004.
- 59.** Guven H, Gilljam M, Chambers BJ, Ljunggren HG, Christensson B, Kimby E, Dilber MS. Expansion of natural killer (NK) and natural killer-like T (NKT)-cell populations derived from patients with B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): a potential source for cellular immunotherapy. 2003 Oct;17(10):1973-80.
- 60.** Lai R, O'Brien S, Maushouri T, Rogers A, Kantarjian H, Keating M, Albitar M. Prognostic value of plasma interleukin-6 levels in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*;95 (5): 1071-1075, 2002.
- 61.** Ferrajoli A, Keating MJ, Manshouri T, Giles FJ, Dey A, Estrov Z, Koller CA, Kurzrock R, Thomas DA, Faderi S, Lerner S, O'Brien S, Albitar M. The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood*;100 (4): 1215-1219, 2002.
- 62.** Christiansen I, Gidlöf C, Wallgren AC, Simonsson B, Tötterman TH. Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule 1 are increased in chronic B-lymphocytic leukemia and correlate with clinical stage and prognostic markers. *Blood*; 84 (9): 3010-3016, 1994.
- 63.** Molica S, Vitelli G, Levato D, Gandolfo GM, Liso V. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk of progression in early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*; 107(3):605-10, 1999.
- 64.** Robertson LE, Plunkett W, McConnell K, Keating MJ, McDonnell TJ. Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia*; 10 (3): 456-459, 1996.
- 65.** Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. Lymphocyte Maturation and Expression of Antigen Receptor Genes. 2000; 175-181.
- 66.** Oscier DG, Stevens J, Hamblin TJ, Pickering RM, Fitchett M. Prognostic factors in stage A B-cell lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 1990; 76:348-351.
- 67.** Hamblin TJ, Davis Z, Garnier A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:1840-1847.
- 68.** Düring J, Nüchel H, Cremer M, Führer A, Halfmeyer K, Fandrey J, Möröy T, Hitpass-Klein L and Dührsen U. ZAP70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2003;17: 2426-2434.

- 69.** Sebestyén A., Berczi L., Mihalik R., Páku S., Matolcsy A., Kopper L.: First Institute of Pathology, Semmelweis University of Medicine, Budapest and *Department of Pathology, University Medical School of Pécs, Hungary. *British Journal of Haematology*, 1999, 104, 412-419.
- 70.** Deaglio, S., Mallone, R., Baj, G., Arnulfo, A., Surico, N., Dianzani, U., Mehta, K., Malavasi, F.: CD38/CD31, a receptor/ligand System Ruling Adhesion and Signaling in Human Leukocytes. *Chem Immunol.*, 75:99-120, 2000.
- 71.** Kumagai, M., Coustan-Smith, E., Murray, DJ., Silvennoinen, O., Murti, KG., Evans, WE., Malavasi, F., Campana, D.: Ligation of CD38 Suppresses Human B Lymphopoiesis. *J Exp Med.*, 181:1101-1110, 1995.
- 72.** Ibrahim S, Keating M, Do KA, et al. CD 38 expression as an important prognostic factor in B-cell Chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001; 95: 2455-2457.
- 73.** Deaglio, S., Mehta, K., Malavasi, F.: Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leuk Res.*, 25:1-12, 2001.
- 74.** Bene MC. What Is ZAP-70? *Cytometry B Clin Cytom*. 70 (4): 204-208, 2006.
- 75.** Chan AC, Irving BA, Fraser JD, Weiss A. The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 88 (20): 9166-9170, 1991.
- 76.** Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR, zeta chain. *Cell*; 71 (4): 649-62, 1992.
- 77.** Latour S, Veillette A. Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling *Curr Opin Immunol*; 13 (3): 299-306, 2001.
- 78.** Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, Kipps TJ. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 100 (13): 4609-14, 2002.
- 79.** Van Oers NS, Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signaling processes. *Semin Immunol*; 7 (4): 227-236, 1995.
- 80.** Bosch F, Muntanola A, Gine E, Carrio A, Villamor N, Moreno C, Crespo M, Montserrat E. Clinical Implications of ZAP-70 Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*; 70 (4): 214-217, 2006.
- 81.** Crespo M, Villamor N, Gine E, Muntanola A, Colomer D, Marafioti T, Jones M, Camos M, Campo E, Montserrat E, Bosch E. ZAP-70 expression in normal pro/pre B cells, mature B cells, and in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*. 12 (3 Pt 1): 726-34, 2006.

- 82.** Nolz JC, Tschumper RC, Pittner BT, Darce JR, Kay NE, Jelinek DF. ZAP-70 is expressed by a subset of normal human B-lymphocytes displaying an activated phenotype. *Leukemia*;19(6); 1018-24, 2005.
- 83.** Sheridan R, Mounajjed T, Ehrmann DE, Hurtubise PE, Schragger A. Comparison of Bone Marrow and Peripheral Blood ZAP-70 Status Examined by flow Cytometrik Immunophenotyping in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cytometry.B Clin Cytom*; 70 (4): 320-321, 2006.
- 84.** Del Principe MI, Del Poeta G, Buccisano F, Maurillo L, Venditti A, Zuchetto A, Marini R, Niscola P, Consalvo MAI, Mazzone C, Ottaviani L, Panetta P, Bruno A, Bomben R, Suppo G, Gegan M, Gattei V, Fabritiis P, Cantonetti M, Lo Coco F, Del Principe D, Amadori S. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 108 (3): 853-861, 2006.
- 85.** Wiestner A, Posenwald A, Barry TS, et al. ZAP70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003; 101: 4944-4951.
- 86.** Gibbs G, Bromidge T, Howe D, Hopkins J, Johnson S. Comparison of flow cytometric methods for the measurement of ZAP70 expression in a routine diagnostic laboratory. *Clin. Lab. Haematol.* 2005; 27: 258-266.
- 87.** Schroers R, Griesinger F, Trumper L, et al: Combined analysis of ZAP70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2005; 19: 750-758.
- 88.** Kipps TJ. Signal transduction pathways and mechanisms of apoptosis in CLL B lymphocytes: their role in CLL pathogenesis. *Hematol Cell Ther* 39. 1997;(Suppl 1):17-27.
- 89.** Rassenti LZ, Kipps TJ. Clinical utility of assessing ZAP-70 and CD38 in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*; 70 (4): 209-13. 2006.
- 90.** Wilhelm C, Neubauer A, Brendel C. Discordant results of flow cytometric ZAP-70 expression status in B-CLL samples if different gating strategies are applied. *Cytometry B Clin Cytom*; 70 (4): 242-50, 2006.
- 91.** Bauvois, B., Durant, L., Laboureau, J., Barthelemy, E., Rouillard, D., Boulla, G., Deterre, P.: Upregulation of CD38 gene expression in leukemic B cells by interferon types I and II. *J Interferon Cytokine Res.* 1999 Sep;19(9):1059-66.
- 92.** Durig, J., Naschar, M., Schmucker, U., Renzing-Kohler, K., Holter, T., Huttmann, A., Duhrsen, U.: CD38 Expression is an Important Prognostic Factor in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia*, 16:30-35, 2002.

93. Reid S, Yang S, Brown R, Kabani K, Aklilu E, Ho PJ, Woodland N, Joshua D. Characterisation and relevance of CD138-negative plasma cells in plasma cell myeloma. *Int J Lab Hematol.* 2010 Dec;32(6 Pt 1):e190-6. doi: 10.1111/j.1751-553X.2010.01222.x.

94. Türkiye Klinikleri 2007 Cilt:3 Sayı:43

95. Dariusz Wołowicz,^{*} Jarosław Dybko, Tomasz Wróbel, Donata Urbaniak-Kujda, Bożena Jaźwiec, Beata Tomaszewska-Toporska, Katarzyna Kapelko-Słowik, Stanisław Potoczek, and Kazimierz Kuliczkowski. Circulating sCD138 and Some Angiogenesis-Involved Cytokines Help to Anticipate the Disease Progression of Early-Stage *B*-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Mediators Inflamm.* 2006; 2006(3): 42394.