

T.C  
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
Patoloji Anabilim Dalı

KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ / KÜÇÜK LENFOSİTİK LENFOMADA  
ZAP-70, CD38 VE FAS/FAS LİGAND EKSPRESYONUNUN  
KEMİK İLİĞİ TUTULUM PATERNLERİYLE İLİŞKİSİ VE  
PROGNOSTİK DEĞERİ

UZMANLIK TEZİ  
Dr. Demet KOCATEPE ÇAVDAR

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Aydın İŞİSAĞ

Manisa, 2008

Patoloji eğitimim ve tez hazırlığım süresince bilgisini, desteğini ve anlayışını benden esirgemeyen, yol göstericim, tez hocam Prof. Dr. Aydın İşisağ'a, deneyimlerini benimle paylaşan, meslek hayatıma katkılarını asla unutmayacağım Prof. Dr. Ali Rıza Kandiloğlu, Doç. Dr. Semin Ayhan, Yrd. Doç. Dr. Peyker Temiz ve Yrd. Doç. Dr. Nalan Neşe'ye, kısa bir süre çalışma olanağı bulduğum Doç. Dr. M. Akif Demir'e, iş ve arkadaşlığı mükemmel bir uyumla harmanladığımız asistan arkadaşlarıma, tezime katkılarından dolayı Manisa Devlet Hastanesi Patoloji Laboratuvarı uzman doktorlarına, tezimin klinik korelasyonunda yardımlarını azımsayamayacağım Doç. Dr. Ülkü Ergene'ye ve başta tez döneminde olmak üzere tüm eğitimimde keyifle çalıştığımız teknisyen, sekreter ve arşiv görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İhtiyacım olan her an yanımda yer alan, en büyük destekçilerim annem, babam ve kardeşlerime, bana sınırsız anlayış ve yardımını sunan yol arkadaşım eşime ve yaşamımın en güzel renkleri kızlarıma da teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

I.GİRİŞ .....	5
II.GENEL BİLGİLER .....	6
III.GEREÇ VE YÖNTEM .....	20
IV.BULGULAR .....	23
V.TARTIŞMA .....	33
VI.SONUÇ VE ÖNERİLER .....	38
VII.ÖZET .....	39
VIII.İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY) .....	40
IX. KAYNAKÇA .....	41

## KISALTMALAR

CLL	kronik lenfositik lösemi
SLL	küçük lenfositik lenfoma
IgV <sub>H</sub>	immunglobulin ağır zincir değişken bölge
ZAP-70	zeta zincir ilişkili protein-70
Fas-L	fas-ligand
MCL	manşon hücreli lenfoma
BCR	B hücre reseptörü
H&E	hematoksilen-eosin
TBS	tris tampon solüsyonu

## GİRİŞ

B hücreli kronik lenfositik lösemi / küçük lenfositik lenfoma (CLL/SLL), matür görünümlü lenfosit infiltrasyonu ile karakterize, oldukça değişik klinik seyir gösteren ve erişkin lösemileri içinde en sık izlenen lenfoid malignitedir (1-13). Hastaların bir kısmı sessiz bir klinik sergilerken, bir kısmı hızlı ilerleyen agresif bir davranış gösterir. Bu değişken klinik seyir, hastaların tedavi protokollerinin belirlenmesinde önem kazanmaktadır. Bu iki grubu belirlemede evreleme sistemleri,  $\beta$ 2 mikroglobulin, timidin kinaz ve CD23 serum düzeyleri yanı sıra p53 ekspresyonundan faydalanılmaktadır (1, 2).

Son zamanlarda hastaların prognozunu belirleyen faktörler arasında immunglobulin ağır zincir değişken bölge (IgV<sub>H</sub>) mutasyonunun önemi üzerinde durulmaktadır. Bu genin mutasyonunun yokluğunun hızlı ilerleyen hastalık ve kısa süreli sağkalım ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (3, 4, 5, 6).

CLL/SLL'li olguların IgV<sub>H</sub> mutasyonsuz formlarında sitoplazmik bir tirozin kinaz olan zeta zincir ilişkili protein-70 (ZAP-70) yanı sıra CD38 ekspresyonunun saptandığı bildirilmektedir. Bu belirleyicilerin oldukça pahalı ve zahmetli yöntemlerle saptanan IgV<sub>H</sub> mutasyonunun yerine kullanılabileceği ileri sürülmektedir (3, 5, 7).

Hücre apoptozisini indükleyen genler olan Fas ve Fas-ligand (Fas-L) ekspresyonunun da acil kemoterapi gerektiren hastaların saptanmasında kullanılabilecek belirleyiciler olduğu düşünülmektedir (14, 15).

Çalışmamızda amaç, üzerinde durulan belirleyiciler olan ZAP-70, CD38, Fas ve Fas-L ekspresyonunun, kemik iliği tutulum paterni ve prognoz ile ilişkisini ortaya koymaktır.

## GENEL BİLGİLER

B hücreli kronik lenfositik lösemi (CLL) ve küçük lenfositik lenfoma (SLL) klinikopatolojik özelliklerinin benzerliği nedeniyle, 2001 Dünya Sağlık Örgütü'nün hematolojik maligniteleri sınıflama planında tek bir kategori (CLL/SLL) altında ele alınmıştır (16). CLL 1900'lerin başında tanınmaya başlanmış bir antite olup, 1970'lerde klinikopatolojik sınıflamalarda diffüz, düşük dereceli, B hücreli non-Hodgkin lenfomalar içinde kategorize edilmiştir (16). CLL/SLL tipik olarak CD5 ve CD23 yüzey antijeni ekspresyon eden küçük B lenfositlerle karakterize, düşük dereceli bir tümördür. CLL lösemik faz, SLL ise nodal veya solid faz ile ilişkilidir (1, 16, 17).

CLL ile SLL'nin benzer morfolojik ve immunofenotipik özelliklere sahip olmaları, aynı hastalığın farklı manifestasyonları olarak kabul görülmesine ve bu antitelerin tek bir hastalık adı altında tanımlanmasına neden olmuştur (16). Periferik kan, kemik iliği ve lenf nodunda izlenen CLL/SLL'de prolenfositler ve paraimmunoblastlarla iç içe geçmiş monomorfik, küçük, yuvarlak, matür görünümlü B lenfositler dikkat çekicidir (17-19).

CLL/SLL, revize edilmiş Avrupa-Amerika lenfoma sınıflamasında (REAL) B hücreli kronik lenfositik lösemi; Rappaport sınıflamasında iyi diferansiye lenfositik lenfoma; Kiel sınıflamasında kronik lenfositik lösemi; Lukes ve Collins sınıflamasında B kronik lenfositik lösemi ve WHO sınıflamasında kronik lenfositik lösemi / küçük lenfositik lenfoma olarak yer almıştır (17, 18).

### Epidemiyoloji

CLL/SLL, özellikle batı ülkelerinde erişkin lösemileri içinde en sık görülen tiptir ve non-Hodgkin lenfomaların %3- %10'unu oluşturmaktadır (1,

3, 17, 18). CLL/SLL tipik olarak yaşlıları etkiler ve dördüncü dekkaddan önce nadirdir (16, 20, 21). Hastaların büyük bölümü 50 yaşın üzerinde olup, 80 yaşından sonra her 100.000 kişinin 50 sinde görülür (20). Batı ülkelerindeki insidansın aksine Uzak Doğulular ve siyahlarda görülme sıklığı oldukça düşüktür. Erkeklerde, kadınlardan 2 kat daha sık görülmektedir (1,16-18, 20, 21). CLL/SLL riskinin çiftçilerde, kauçuk işçilerinde, asbest ile çalışanlarda ve ayrıca benzene maruziyette arttığı gözlenmiştir. Diğer lösemilerden farklı olarak, radyasyon öyküsünün etyolojide önemli olmadığı söylenmektedir (20, 21).

Genetik faktörlerin de lösemi gelişmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. CLL/SLL ailesel lösemiler içinde en sık rastlanan lösemi olup, aynı ailenin değişik bireylerinde CLL/SLL saptanan yayınlar mevcuttur (20, 21). Birinci dereceden akrabasında CLL/SLL saptanan kişilerde, diğer bireylere göre görülme sıklığının 3 kat daha fazla olduğu söylenmektedir (21).

### **Klinik**

Hastaların büyük çoğunluğu asemptomatiktir ve sıklıkla rutin testlerde lenfosit sayısının artışıyla görülmesi uyarıcı olur (1, 17, 18, 20). Bazı olgular kan ve kemik iliğinde malign hücre popülasyonunun artışıyla ilgili semptom gösterirler. Hastalarda yorgunluk, egzersiz intoleransı, ateş, kilo kaybı, gece terlemesi, otoimmün hemolitik anemi, enfeksiyonlar, splenomegali, hepatomegali, lenfadenopati yanı sıra ektranodal infiltratlar görülebilir (1, 17, 20). İnfeksiyon en önemli komplikasyonlardan biri olup ölüm nedenlerinin en sık karşılaşılanıdır (1).

Periferik kan ve kemik iliği tutulumu olduğunda tanı anında genelde lenfosit sayısı artmıştır. Lenfosit sayısı  $<10 \times 10^9/L$  olduğunda ise tanı için CLL/SLL immunofenotip ve morfolojisi ile tipik görünümün olması şarttır (18).

Lenf nodu, karaciğer ve dalak diğer tipik tutulum alanlarıdır. Dalak tutulduğunda boyutu büyümüş, genişlemiş ve ağırlığı 4 kilograma ulaşmış olabilir. Bunların dışında deri, akciğer, meme ve okuler adneks gibi ektranodal tutulum alanları olabilir (18).

CLL/SLL hastalarında yaygınlık, prognoz ve tedavi gerekliliğini değerlendirmek için Rai ve Binet evreleme sistemleri kullanılmaktadır (1).

Modifiye Rai evreleme sisteminde, hastalar üç grupta sınıflanmıştır:

- a) Düşük riskli hastalar: periferik kan ve kemik iliğinde yalnızca lenfositler vardır (evre 0).
- b) Orta riskli hastalar: lenfositler ve lenfadenopati (evre I), ve/veya hepatosplenomegali (evre II).
- c) Yüksek riskli hastalar : lenfositler ile birlikte anemi (evre III), ve/veya trombositopeni (evre IV) (1, 20).

Binet evreleme sisteminde ise tutulu lenfoid alan sayısı, hemoglobinin ve trombosit değerleri göz önüne alınmıştır:

- a) Evre A: Normal hemoglobin, normal trombosit sayısı ve <3 lenf nodu tutulumu
- b) Evre B: Normal hemoglobin, normal trombosit sayısı ve  $\geq 3$  lenf nodu tutulumu
- c) Evre C: Anemi (Hemoglobin < 10 g/dl) ve/veya trombositopeni ( $< 1 \times 10^9/l$ ), lenf nodu sayısı her ne olursa olsun (1, 20).

### **Patolojik özellikler**

Kemik iliği ve periferik kanda CLL/SLL hücreleri, dar, bazofilik sitoplazmalı, kümelenmiş kromatin paternine sahip, düzgün sınırlı küçük lenfositlerdir. Nükleol yoktur veya belirsizdir (17, 20). Büyük belirgin nükleole sahip prolenfositlerin oranı, yayma preparatlarda %2'den azdır. Sayılarının artışı agresif bir klinik seyir, p53 anormalliği ve kromozom 12 trizomisi ile koreledir. Artmış prolenfositli CLL/SLL varyantta prolenfositler %10'dan fazla, ancak %55'ten az olmalıdır (18).

Kemik iliği tutulumu nodüler, interstisyel, diffüz veya her üçünün kombinasyonu şeklinde olabilir (20). Pseudofoliküller, kemik iliğinde lenf nodlarına oranla daha az görülür. Kemik iliği tutulum paterni prognoz ile ilişkili olup, nodüler ve interstisyel patern erken dönem CLL'de izlenir. İlerlemiş ve kemik iliği yetmezliği gelişmiş hastalarda infiltrasyon genellikle diffüz paterndedir (18)



Bazı CLL/SLL olguları atipik morfoloji gösterebilir. Bu olgularda değişen oranlarda atipik lenfositlere (prolenfositler, büyük lenfositler ve çentikli hücreler) rastlanabilir, ancak immunofenotipleri CLL/SLL için karakteristik özelliklere sahiptir (18).

Neoplastik hücreler küçük, matür görünümlü lenfosit benzer. Hücre boyutu 6-12 µm ve morfolojik olarak normal görünümde olup, transforme olmamış lenfosit formundan ayırmak olanaksızdır. CLL/SLL'de sitoplazma genellikle dardır, geniş sitoplazma plazmasitoid varyantta görülür. Hücresel proliferasyon monotondur, bazen hastalarda malign lenfoid hücrelerin heterojen popülasyonu görülebilir. Nükleus yuvarlaktır, hafif nükleer membran kontur düzensizliği vardır ve birkaç küçük nükleol gözlenebilir. Mitotik aktivite düşüktür. Proliferasyon merkezleri olarak da bilinen pseudofoliküller küçük, orta ve büyük boy hücreler içerir. Prolenfositler orta boyda dağılmış kromatin ve küçük nükleole sahip iken, paraimmunoblastlar yuvarlak veya oval nükleuslu, kromatin dağılımı gösteren, santral eozinofilik nükleol ve hafif bazofilik sitoplazmaya sahip orta-büyük boy hücrelerdir. Pseudofoliküllerin boyutu ve paraimmunoblastların sayısı olgudan olguya değişiklikler gösterir. Elektron mikroskopta yuvarlak, oldukça büyük mitokondri yoğunluğu hücrelerin bir kenarında gözlenir (17).

CLL/SLL ile tutulu olan lenf nodu normal boyutta olabilir, ancak sıklıkla büyümüştür. Lenf nodu sert, beyaz, balık eti görünümündedir. Tümör çevre yumuşak dokuya yayılım gösterebilir. Ekstranodal tutulum alanlarında da benzer görünüm mevcuttur (17). Lenf nodunun olağan histolojik yapısı bozulmuştur. Koyu, küçük lenfositlerin bulunduğu zeminde büyük hücreleri içeren soluk görünümlü, pseudofolikül yapıları izlenebilir. Hastaların %75'ten fazlasında lenf nodu yapısı tamamen malign süreç ile etkilenmiş görünümündedir. Bazı hastalarda rezidüel lenfoid doku alanları görülebilir. Nadiren tutulum interfolliküler olabilir.

Dalakta beyaz pulpa tutulumu belirgindir, ancak kırmızı pulpa da tutulabilir. Pseudofoliküller görülebilir, ancak lenf nodlarında görülenden daha az belirgindir (20).

Neoplastik hücreler ince iğne aspirasyon materyallerinde ve imprint preparatlarda da, küçük, transforme olmamış lenfositlere benzer morfolojidedir (20). Hücreler soluk bazofilik, dar sitoplazmaya sahiptir. Doku kesitlerinde olduğu gibi nükleus birkaç belli belirsiz nükleol ve kromatin kümelenmesi gösterir. Pseudofoliküler proliferasyon merkezlerinin çokluğuna bağlı olarak değişik sayıda prolenfosit ve büyük transforme hücreler (immunoblastlar) içerebilir. Bu hücreler CLL hücrelerinden daha geniş sitoplazmaya sahiptir. Bu transforme hücreler bir veya daha fazla belirgin nükleol barındırır, ancak sitoplazmik bazofili göstermezler. Mast hücreleri artmış ve plazma hücreleri sıklıkla azalmıştır (20).

### **İmmunofenotip**

CLL/SLL'nin kendine özgü bir immunprofili vardır. Lösemik B hücreler, matür B hücrelerdeki gibi CD19 yanı sıra, daha az CD20 ve beraberinde CD5 ekspresyonu gösterirler. Ayrıca CD23, CD43 pozitif, CD79b zayıf pozitif veya negatif, FMC7, CD10 ve cyclin D1 negatif immunfenotip sergiler (17, 20, 22). Neoplastik hücreler, normal B lenfositlerin ancak %10'u kadar yüzey immunglobulin dansitesi gösterdiğinden, özellikle IgM ve IgD olmak üzere, zayıf yüzey immunglobulin ekspresyonu gösterirler (17, 20). Olguların %60-75 kadarında CD21 yanı sıra CD11c, CD25 ve CD14 ekspresyonu gözlenebilir (17, 18).

Kronik lenfositik lösemi ve küçük lenfositik lenfoma arasındaki bilinen tek immunolojik fark, küçük lenfositik lenfoma hücrelerindeki bir yapışma molekülü olan lenfosit fonksiyon ilişkili antijen (LFA-1) ekspresyonudur (17).

CD23 ve cyclin D1, CLL/SLL ile manşon hücreli lenfoma ayırımında önemlidir. Bazı olgularda CD23 negatif veya parsiyel pozitifdir ve bazı manşon hücreli lenfomalar CD23 eksprese edebilirler. Bu durumda cyclin D1 ayırıcı tanıda yardımcı olur (18).

Plazmasitoid diferansiyasyon CD25, CD71 ekspresyonu ve CD5 negatifliği ile birlikte (17).

## Sitogenetik ve moleküler özellikler

B hücreli lenfomaların karakteristik özelliği CLL/SLL klonal immunglobulin rearanjmanı gösteren B hücrelerden köken almasıdır. CLL görece matür B lenfositlerden derive olduğu için, hem immunglobulin ağır zincir, hem de hafif zincirlerinde rearanjman dikkat çekicidir (17, 20). Olguların yaklaşık %8'inde T hücre reseptör  $\beta$  zincir gen lokusunda rearanjman izlenir. Yüksek dereceli B hücreli non-Hodgkin lenfomaların tersine CLL/SLL'de somatik hipermutasyonlar görülmez (17).

Onkogen ve tümör süpresor gen aşırı ekspresyonu değişkendir. Olguların üçte ikisinde *MYC* düzeylerinde, üçte birinde de *RAS* düzeylerinde artış gözlenmiştir. Bu artışa karşın onkogenlerde mutasyon olmayabilir. *ABL* düzeylerinde artış olguların %29'unda, plazmasitoid varyant olgularının ise %46'sında izlenmektedir. *ABL* düzeylerinde artış agresif bir klinik seyir ile ilişkilidir. *P53* aşırı ekspresyonu olguların yaklaşık %20'sinde izlenir ve bu ekspresyon *P53* geninin mutasyonu sonucudur. *SRC* protoonkogen aktivitesi CLL/SLL'de düşüktür. 13q12.3 sitogenetik anomalisi BRCA-2 gen inaktivasyonu ile ilişkili olabilir (17).

Sitogenetik değerlendirmede nadir olgularda t(14;18) translokasyonu bulunur. CLL/SLL'lerin çoğunda bcl-2 protein ekspresyonu miktarı artmıştır. SLL'de küçük hücrelerde görülmeyen retinoblastom protein ekspresyonu pseudofoliküllerde yer alan hücrelerde görülebilir (17).

Epstein-Barr virüsü, CLL/SLL'nin küçük neoplastik hücrelerinde görülmez, ancak Hodgkin lenfoma veya yüksek dereceli non-Hodgkin lenfomaya transformasyon ile ilişkili olabilir (17).

Olguların çoğunda, hücrelerin %5'ten azı S fazındadır ve hücrelerin küçük bir fraksiyonu MIB-1 proliferasyon proteini eksprese eder. MIB-1'in ekspresyonu sıklıkla küçük neoplastik hücrelerden çok pseudofoliküler proliferasyon merkezlerinde izlenir. Olguların yaklaşık %90'ı diploiddir (17).

## Genetik anomaliler

CLL/SLL hücreleri hastalığa spesifik olmayan birkaç genetik anormallik taşıyabilir. Diğer lenfoproliferatif hastalıkların tersine translokasyonlar nadir

görülür, en sık rastlanan anomali, genetik materyal kazancı veya kaybının yol açtığı anomalilerdir (1).

En sık görülen anomaliler; olguların yarısından fazlasında saptanan 13. kromozom uzun kolunda delesyon, kromozom 12 trizomisi, ataksi telenjiektazi mutasyon (ATM) tümör supresör gen lokalizasyonu 11q22-q23 bandında delesyon ve 17p13 bandında delesyondur (1, 20)

Olguların yarısından fazlasında tek anomali, %20'sinde iki ve %10'dan fazlasında ikiden fazla anomali gözlenir. Çoklu değişken analizlerde genetik anomalilerin bağımsız prognostik faktörler olduğu ve 13q delesyonunun iyi prognozlu olduğu saptanmıştır (1).

### **Prognostik faktörler**

CLL/SLL, klinik gidişi oldukça heterojenite gösteren bir hastalıktır (1-13). Sağkalım süresi bazen aylarla ölçülse de çeşitli kaynaklarda ortalama 8-10 yıl olarak verilmektedir. İyi prognoz ve tedaviye rağmen hastaların büyük kısmı sonuç olarak bu hastalıktan ölür. Tam kür oldukça nadirdir. Bazı hastalarda artmış lenfosit sayısı, lenf nodu ve dalakta büyüme, anemi ve trombositopeni gelişmesi progresyonu gösterir. Bu hastalara uygulanan erken ve yoğun tedaviye rağmen sağkalım süresi birkaç yıldır. Bunun tersine bazı hastaların kliniği oldukça iyidir ve stabil veya yavaş artan lenfositoz ile terapi gereksinimi yoktur. Yaşam süresi hastalıktan etkilenmemiş bireylerle benzerdir. Diğer hematopoetik malignitelerin tersine yaşın biyolojik özellikler ve prognoz ile ilişkisi yoktur. Tüm bu nedenlerle CLL/SLL'li olgularda tanı anında prognostik faktörlerin belirlenmesi hastaya en uygun yaklaşımı sağlar (1).

Klinik prognostik faktörler

Klasik klinik prognostik faktörler üç tanedir:

- a) Rai veya Binet klinik evrelemesi. Rai'ye göre düşük riskli ve Binet'e göre evre A olgular iyi prognozludur.
- b) Lenfosit sayısının ikiye katlanma zamanı. 6 aydan kısa ise kötü prognozludur.

- c) Kemik iliği infiltrasyon paterni. Diffüz infiltrasyon kötü prognoz ile koreledir (1).

#### Klasik biyolojik prognostik faktörler

Bazı biyolojik parametreler prognostik önem taşı. Bunlar:

- a) Periferik kanda prolenfositler %10'dan fazla ise kötü prognoz işaretidir.
- b) Serum  $\beta$ 2-mikroglobulin düzeyi, kemoterapiye cevap ile ters orantılıdır.
- c) Timidin kinaz serum düzeyleri sağkalım süresi ile ters orantılıdır.
- d) Serum CD23 düzeyleri sağkalım süresi ile ters orantılıdır.
- e) P53 ekspresyonu prolenfositik transformasyon ile koreledir (1, 2).

#### Yeni biyolojik prognostik faktörler

Son yıllarda yeni biyolojik belirleyicilerin CLL/SLL hastalarında tanı anında risk değerlendirmesinde yardımcı olduğu söylenmektedir.

- a) İmmunglobulin değişken bölge (IgV<sub>H</sub>) gen somatik mutasyonları. CLL/SLL hücrelerinde IgV<sub>H</sub> gen mutasyonunun varlığı veya yokluğu, farklı klinik ve prognoz ile korelasyon gösterir. Mutasyonsuz olgularda IgV<sub>H</sub> geni germline sekansına >%98 benzerlik gösterir ve bu durum agresif gidişin göstergesidir. Bu olgularda, <%98 homoloji gösteren mutasyonlu olgulara göre daha kısa yaşam süresi bildirilmiştir. Ig gen sekansı belirlenmesi oldukça pahalı ve zor bir teknik işlemdir.
- b) CLL/SLL hücrelerinin yüzeyinden eksprese edilen CD38. CD38 pozitif hücrelere sahip olgularda progresyonun hızlı ve yaşam süresinin kısa olduğu bildirilmiştir. Bu belirleyicinin, mutasyonel durumun yerine kullanılacak bir parametre olabileceği düşünülmektedir. Halen hastaların iyi ve kötü prognozlu olarak ayrılmasında CD38 ekspresyonunun değeri tartışmalıdır.
- c) CLL/SLL hücrelerinde intrasellüler ZAP-70 ekspresyonu. Lösemik hücrelerde >%20 ZAP-70 ekspresyonu negatif prognostik değer taşır. ZAP-70 ekspresyonunun da IgV<sub>H</sub> mutasyonel durumu yerine kullanılacak bir belirleyici olduğu düşünülmektedir.

d) Kromozomal anormallikler. CLL/SLL'ye özgü tek bir anomali yoktur. Birkaç anomali bildirilmiştir ve bunların prognostik değer taşıdığı bildirilmektedir. 17p delesyonu kısa yaşam süresi ile korelidir ve bunu 11q delesyonu takip eder. 13q delesyonu saptanan olgularda ise yaşam süresinin daha uzun bulunduğu söylenmektedir. 12. kromozom trizomisinin normal karyotipten farklı olmayan bir sağkalıma sahip olduğu bildirilmiştir (1, 2, 10).

### **Morfolojik transformasyon ve klinik progresyon**

Hastaların yaklaşık %3 ile %20'sinde hastalık stabil kalmayabilir ve büyük hücreli lenfomaya ilerleyebilir, prolenfositik veya blastik transformasyon gösterebilir veya Hodgkin lenfoma gelişebilir (17, 20).

Büyük hücreli lenfomaya dönüşmüş CLL/SLL, Richter sendromu olarak tanımlanan yüksek dereceli neoplazidir (18, 20). Bu değişiklik kötü prognoz ve kısa yaşam süresi ile ilişkilidir. Etkilenen hastalarda hızlı büyüyen kitle, serum LDH yükselmesi ve B semptomları vardır. Morfolojik özellikleri diğer büyük B hücreli lenfomalara benzer görünümündedir ve sentroblast veya immunoblast benzeri hücrelerden oluşur (20).

Nadir olgularda, büyük bölümü noduler sklerozan veya mikst sellüler tip Hodgkin lenfoma gelişebilir (17, 18). Hodgkin lenfoma komplikasyonu gelişmiş hastalarda prognoz kötüdür, ancak diffüz büyük B hücreli lenfomaya dönüşmüş olguların prognozundan daha iyidir.

### **Ayırıcı tanı**

Ayırıcı tanıda göz önünde bulundurulması gereken birkaç antite vardır. Bunlar arasında manşon hücreli lenfoma (MCL), marjinal zon lenfoma, özellikle lenf nodu tutulumu olduğunda diffüz lenfoid hiperplaziler ve bazı Hodgkin lenfoma tipleri yer alır (17, 20).

CLL/SLL'yi, iyi hazırlanmış preparatlarda hücresel ayrıntıyı göz önüne alarak manşon hücreli lenfomadan ayırmak gereklidir. Bu ayırım oldukça önemlidir. Çünkü bu antitenin klinik gidişi ve tedavisi farklılıklar göstermektedir. CLL/SLL'de neoplastik lenfositler yuvarlak ve düzgün nükleer

membrana sahip iken, MCL'de hafif veya belirgin nükleer düzensizlik izlenir. CLL/SLL'nin tersine MCL'de hücrel proliferasyon monotondur, nadiren zeminde histiositler bulunur. Lenf nodu tutulumu olduğunda CLL/SLL'de genellikle pseudofoliküller vardır. MCL'de ise pseudofoliküller nadiren bulunur ve bu olguların prognozu CLL/SLL'ye benzer. Her ikisinde de mitotik aktivite düşüktür. İmmunolojik çalışmalar bu iki antiteyi ayırmada yardımcıdır. CLL/SLL neoplastik hücreleri CD20, CD5 ve CD23 pozitif, cyclinD1 negatiftir. MCL ise CD20 ve CD5 pozitif, CD23 negatiftir; ayrıca cyclinD1 ekspresyonu izlenir (17, 20, 23).

Marjinal zon lenfomayı da ayırıcı tanıda akılda tutmak gereklidir. Marjinal zon lenfomada neoplastik hücreler küçük, büklümlü nükleer konturlara sahip ve geniş, şeffaf sitoplazmalı hücrelerdir. Bu hücreler immunohistokimyasal olarak CD5 ve CD23 negatiftirler (17).

Her ikisinde de küçük matür görünümlü lenfositlerin diffüz proliferasyonu izlendiğinden, diffüz interstisiyel hiperplaziyi CLL/SLL'den ayırmak gereklidir. Reaktif folliküllerin, açık sinüslerin ve genişlemiş interfolliküler alanların bulunması, perikapsüler infiltrasyonun ise bulunmaması reaktif lenf noduna ait değişikliklerdir. Hemen hemen tüm CLL/SLL olgularında izlenen pseudofoliküler proliferasyon merkezleri reaktif lenf nodunda gözlenmez. Ayrıca, reaktif süreçte küçük lenfositler T hücre fenotipi sergilerken, CLL/SLL de B hücre kökenlidir (17, 20).

CLL/SLL ile nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfoma veya lenfositten zengin Hodgkin lenfoma arasında ayırıcı tanı yapmak gerekebilir. Bu iki Hodgkin lenfoma türünde diagnostik Reed-Sternberg hücreleri nadirdir veya bulunmayabilir. Bunun yanında bazı CLL/SLL olguları Reed-Sternberg hücrelerinden ayrılamayan hücreler içerebilir. Büyük nodüllerin varlığı ve germinal merkezlerin progresif transformasyonu nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfomayı pseudofolikülleri bulunan CLL/SLL'den ayırmada yardımcı olabilir. Nadir olgularda CLL/SLL ile lenfositten zengin Hodgkin lenfoma arasında morfolojik ayırıcı tanı yapmak imkansızdır. Bu durumda immunolojik belirleyiciler yardımcı olur (17).

## İmmun belirleyiciler

### ZAP-70

Zeta zinciri ilişkili protein-70 geninin (ZAP-70) ürünü olan ve aynı adla anılan protein, 70 kDa ağırlığında olup tirozin kinazların Syk ailesinin bir üyesidir (3, 4, 6, 24). Normalde T hücre ve NK hücrelerinden eksprese edilir. T hücre sinyal iletimi yanı sıra T hücre gelişimi ve diferansiyasyonunda da kritik role sahiptir (2, 7, 10, 24, 25). Normal B lenfositlerde bulunmaz. Ancak yakın tarihli çalışmalarla normal tonsil ve dalaktaki aktif B fenotipli hücreler ile kemik iliği pro-B hücrelerince eksprese edildiği anlaşılmış, ayrıca CLL ve B hücreli akut lenfoblastik lösemi hücrelerinde saptanmıştır (24, 26). Akciğer ve barsak epitel hücrelerinde de ZAP-70 ekspresyonu varlığı bilinmektedir.

ZAP-70 2q11.2 yerleşimli, üç fonksiyonel etki alanına sahip, 14 eksondan oluşan bir genidir. Bu etki alanları amino terminal uçta ardışık iki Src homolog 2 (SH2) etki alanı ve karboksi terminal uçta bir tirozin kinaz etki alanıdır (6, 24).

ZAP-70 öncelikle T hücre reseptör sinyal başlangıcında ve sonrasında T hücre aktivasyon, apoptoz ve migrasyonunda görev alır. Kötü seyirli CLL/SLL'de B hücre reseptör sinyaline karıştığı da anlaşılmıştır. CLL/SLL hastalarında artmış B hücre reseptör (BCR) sinyali ZAP-70 ekspresyonu ile ilişkilidir. Defektif BCR sinyali, ZAP-70 negatif hastalarda gözlenir (24, 27).

CLL tanılı, IgV<sub>H</sub> gen mutasyonu gösteren olguların büyük kısmının ZAP-70 negatif, mutasyonsuz formların büyük kısmının ise ZAP-70 pozitif saptandığı çalışmalar mevcuttur. Flow sitometrik çalışmalarda saptanan ZAP-70 ekspresyonu ile IgV<sub>H</sub> mutasyon durumu arasında korelasyon olduğu iddia edilmekte, böylece ZAP-70 ekspresyonunun IgV<sub>H</sub> mutasyonel durumu ile eşdeğer bir prognostik değere sahip olabileceği düşünülmektedir (2, 4, 7,10, 28).

ZAP-70'in lösemik hücrelerdeki ekspresyonu Western blot, kantitatif RT-PCR, immunohistokimya ve flow sitometri gibi farklı metodlarla saptanabilir (28).



ZAP-70 ekspresyonunun kemik iliği tutulum paternleriyle ilişkisi olduğu öne sürülmektedir. Kemik iliğinde diffüz infiltrasyonun izlendiği lösemi olgularında ZAP-70 ekspresyonunun güçlü pozitif, interstisiyel tutulumda değişken oranlarda pozitif ve nodüler tutulumda ise negatif olduğu saptanmıştır (24). CLL'de kemik iliğinin diffüz tutulumunun kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmektedir (18).

### **CD38**

CD38, önceleri timositlerin yüzey antijeni olarak tanımlanmıştır. Daha sonra B hücrelerin yüzeyinde, monositlerde ve NK hücrelerinde bulunmuştur. CD38'in *Aplysia californica* olarak adlandırılan bir deniz yumuşakçasındaki enzimle %30 amino asit benzerliği gösterdiği saptanmıştır. Bu enzim  $Ca^{++}$  mobilizasyonunu sağlayan siklik ADP-riboz (cADPR) üretir. CD38 benzer enzimatik özellikler gösteren ancak, *Aplysia*'nın tersine hem siklaz hem de hidrolaz aktivitesi bulunan çift fonksiyonlu bir ektoenzimdir. Hücre membranı ve intrasellüler yerleşimli CD38, farklı dokularda da saptanmıştır (29).

45 kDa ağırlığında transmembranöz bir glikoprotein olan CD38'in enzimatik aktif bölgesi hücre dışındaki uzun kısmıdır. Ayrıca transmembranöz ve intrasitoplazmik iki bölgeye daha sahiptir. Bu molekül dimer ve tetramerler oluşturmaya eğilimlidir. Bu oligomerler CD38'in enzimatik ürünü olan cADPR'in transportunda görevlidir. CD 38'in diğer molekül formları myelom ve bazı diğer maligniteleri olan hastaların vücut sıvılarında bulunan çözünen özellikteki 39kDa'luk formu ve X'e bağlı agammaglobulinemili hastaların serumunda bulunan 78kDa'luk formudur (29, 30).

Önceleri yalnızca hücre yüzeyinde olduğu düşünülen CD38, şimdilerde hücre içinde mitokondri, endoplazmik retikulum, nükleer zarf ve sitozol gibi farklı lokalizasyonlarda da saptanmıştır (29).

CD38, immatür B hücre progenitörleri, bazı germinal merkez hücreleri ve aktive lenfositler yanı sıra plazma hücrelerinde eksprese edilirken, matür B hücrelerinde oldukça zayıf ekspresyon söz konusudur. Bu ekspresyon paterni lenfosit gelişiminin farklı evrelerini belirlemede kullanılabilir. Göz,

karaciğer, pankreas, beyin, akciğer ve prostat gibi hemopoetik sistem dışındaki dokularda da CD38 ekspresyonu bulunmuştur (29).

CLL/SLL' de prognostik önemi olan IgV<sub>H</sub> mutasyonu ile CD38 arasında korelasyon olduğu söylenmektedir. CD38'in negatif prognostik faktör olduğu ve mutasyonsuz IgV<sub>H</sub> genine sahip CLL/SLL hastalarında eksprese edildiği gözlenmiştir (29, 30). CD38 ekspresyonu ile kompleks sitogenetik anomaliler arasında da korelasyon olduğu bildirilmektedir. 13q delesyonu ile CD38 negatifliğinin, 11q ve 17p delesyonu ile de CD 38 pozitifliğinin korele olduğu öne sürülmektedir (10).

### **Fas / Fas Ligand**

Fas (APO-1/CD95) tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesinin bir üyesi olan 45 kDa'luk tip I membran glikoproteinidir. Aktive T ve B lenfositler, NK hücreler ve myeloid hücreler gibi değişik hücreler tarafından yaygın olarak eksprese edilir (31- 33). Bunun dışında hepatositler yanı sıra renal tubular hücreler ve üroteliyal epitel gibi değişik epitelial hücrelerde eksprese edildiği bildirilmiştir (22). Fas, doğal ligandı olan Fas ligand (Fas L) aracılığıyla kompleks kaspaz kaskadı boyunca apoptozisi indükler (31, 32, 33).

Fas L, TNF ilişkili tip II membran molekülüdür ve aktive T ve NK hücrelerinde, aktive makrofajlarda, nötrofillerde ve bazı epitelial hücrelerde eksprese edilir (31). Testiste Sertoli hücrelerinde ve gözün epitelial hücrelerinde de gözlenir (33). Bu son iki alan, aktive lenfositlerin Fas ilişkili apoptozis yoluyla ortadan kaldırıldığı alanlar olduğundan bağışıklık sisteminin ayrıcalıklı alanları olarak bilinir (31). Elde edilen bulgular, Fas L ekspresyonunun bu ayrıcalıklı alanlarda gelişebilecek tümörlere karşı bağışıklık sisteminin yanıt vermesini engeller nitelikte olduğu yönündedir. (36). Melanom, hepatosellüler karsinom, akciğer karsinomu, mide karsinomu, özofagus karsinomu, kolon karsinomu ve kolon karsinomunun karaciğer metastazı gibi bazı malign neoplastik süreçlerde Fas L ekspresyonu gösterilmiştir. (34- 36).

CLL/SLL'nin klinik gidişi ve patofizyolojisinde en belirgin etkenin apoptozisin disregülasyonu olduğu bildirilmektedir (14). CLL/SLL'de apoptozis indüksiyonunda Fas/FasL etkileşiminin rolü halen açıklanamamıştır. Serum çözüner Fas düzeyi yüksek olan (>6ng/ml) CLL/SLL hastalarında sağkalım süresinin düşük olan hastalara göre daha kısa olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (14, 15). Yüksek Fas düzeyinin lenfadenopati ve splenomegali ile birlikte kısa sağkalım süresi ile ilişkili olduğu; hastalığın hızlı ilerlemesinde tümör hücrelerinin maruz kaldığı apoptozis bloğunun kritik önemi olduğu söylenmektedir (11).

Bu çalışma, kronik lenfositik lösemi/küçük lenfositik lenfomada (CLL/SLL) hızlı progresyon ve agresif gidişle ilişkileri son yıllarda çeşitli çalışmalarla belirlenen zeta associated protein-70 (ZAP-70) ve CD38 proteinleri ile, T-hücre apoptozisini indükleyip T-hücrelerin tümöre karşı immun yanıt vermelerini kısıtlamak suretiyle tümör hücrelerinde apoptozisi engellediğine ve söz konusu tümörde kötü prognostik indikatör olduğuna ilişkin kuşkular bulunan Fas ve bunun ligandı olan Fas ligand (FasL) arasındaki olası ilişkileri değerlendirmek ve bunların ekspresyonunun kemik iliği tutulum paternleri ile bağlantısı olup olmadığını ortaya koymak amacıyla planlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Olgular

Celal Bayar Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı ve Manisa Devlet Hastanesi'nde 2000-2008 yılları arasında kemik iliği biopsisiyle tanıları konmuş 50 CLL/SLL olgusu çalışmaya alındı. Olguların yaş, cinsiyet, lenf nodu tutulumu ve eşlik eden diğer patolojik tanılar gibi bilgileri klinik istem formlarından ya da dosyalarından elde edilerek kaydedildi.

H&E ile boyalı doku preparatları tekrar gözden geçirilerek kemik iliği tutulum paternleri (diffüz, nodüler, interstisiyel) belirlendi. Gerek doku preparatlarındaki histopatolojik özellikler ve gerekse Giemsa ile boyanmış aspirasyon ve imprint preparatlardaki hücre özellikleri gözden geçirildikten sonra her bir olgu için CD3, CD5, CD10, CD20, CD 23, CD43, bcl-2 ve cyclin-D1 ekspresyonları değerlendirilerek tanılar doğrulandı.

### İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi

Olguların bloklarından elde edilen yeni kesitlerde ZAP-70, CD38, Fas ve FasL ekspresyonu, pozitif ve negatif kontroller de kullanılarak streptavidin-biotin peroksidaz yöntemiyle araştırıldı.

24 saat Hollande fiksatifinde tespit edildikten sonra 48 saat glasiyal asetik asitte dekalsifiye edilip ardından rutin yöntemlerle takip edilmiş ve parafine gömülmüş dokulardan hazırlanan bloklardan elde edilen 4 µ kalınlığındaki yeni kesitler poly-L-Lizinle kaplı lamalar üzerine alındı. 55°C sıcaklığındaki etüvde 16 saat bekletilen lamalar ksilol ile deparafinizasyon ve alkol ile rehidratasyon işleminden sonra çeşme suyu ve distile su ile yıkayıp endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak amacıyla 10 dakika %3'lük hidrojen peroksidaz solüsyonunda bekletildi. Çeşme suyu ve distile suda yıkanan kesitler sitratlı tampon solüsyonu (pH=6.0) içinde 3 dakika basınçlı

tencerede kaynatılarak oda sıcaklığına soğutuldu. Çeşme suyu ve distile suda yıkandıktan sonra 4 farklı kap içindeki Tris tampon solüsyonunda (TBS) (pH=7.6) 3'er dakika bekletildi. Ardından tüm immunohistokimyasal belirleyiciler için non-spesifik zemin boyasını önlemek için oda ısısında 10 dakika protein blokajı (protein blok, DAKO, X0909) yapıldı ve primer antikor uygulamasına geçildi.

Kesitlere insan CD38 proteini ekstrasellüler etki alanına yönelik predilüe monoklonal fare antikoruna CD38 Ab-1 (38C03) (Neomarkers, ABD, MS-983-R-7, Lot:983R704A) 60 dakika, ZAP-70 proteinine yönelik predilüe monoklonal fare antikoruna ZAP-70 Ab-1 (2F3.2) (Neomarkers, MS-1911-R-7, Lot:1911R712C) 60 dakika, Fas (CD95) proteinine yönelik predilüe poliklonal tavşan antikoruna Fas Ab-4 (GM30) (Neomarkers, RB-1517-R7, Lot:1517R602A) 30 dakika ve Fas Ligand peptidine yönelik predilüe spesifik tavşan antikoruna Fas Ligand (Neomarkes, RB-9029-R7, Lot:9029R601A) ile 30 dakika inkübasyon uygulandı.

Kesitler, TBS (pH=7.6) ile 4 kez yıkandıktan sonra sekonder antikor işlemi için sırasıyla biotinylated goat antimouse (Lab Vision) ve streptavidin-peroksidaz (Lab Vision) solüsyonlarında 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyonlar arasında yine TBS (pH=7.6) ile 4 kez yıkandı.

Daha sonra kesitler kromojen olarak diaminobenzidin (DAB, Lab Vision) solüsyonunda 15 dakika bekletilip distile suda 3 dakika yıkandı. Asitsiz ve alkolsüz Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapıldıktan sonra çeşme suyu ve distile suda 3'er dakika yıkandı. Alkollerden ve kurutulduktan sonra şeffaflandırma işlemi için ksilolden geçirilen lamalar Entellan® (Merck and Co, Berlin) ile kapatıldı.

Uygulama sırasındaki tüm inkübasyonlar oda sıcaklığında, nemli ve kapalı bir ortamda yapıldı.

### **Boyama oranlarının saptanması**

Tüm değerlendirmeler standart ışık mikroskopunda yapıldı. Her bir preparat kör olarak iki ayrı patolog tarafından (DKÇ ve Aİ) değerlendirildi. ZAP-70 için sitoplazmik boyanma, CD 38 için hücre

membranı boyanması, Fas için hücre membranı boyanması ve Fas ligand için sitoplazmik ve membranöz boyanma dikkate alındı. Skorum işlemi, boyanmanın en yoğun olduğu tümör alanlarında birbirine komşu 500 tümör hücresinin sayılması ve bunlar içerisinde boyananların boyanma göstermeyenlere oranlarının hesaplanmasıyla yapıldı. Bulunan oranlar Zap70 ve Fas için <math><25\%</math> ise 0; <math>25\%-50\%</math> arasındaysa 1; <math>51\%-75\%</math> arasındaysa 2 ve <math>>75\%</math> ise 3 puan verilerek skorlandı. CD38 ve Fas Ligand için ise aynı puanlar sırasıyla <math><10\%</math>; <math>11\%-20\%</math>; <math>21\%-30\%</math> ve <math>>30\%</math> oranları için uygulandı. Bulunan skorlar ayrı ayrı kaydedildikten sonra her bir antikör için elde edilen değerler gözlemciler arası yeniden üretilebilirlik açısından t-testi ile değerlendirildi ve aralarında anlamlı bir farklılık saptanmadı (tümü için  $P>0.05$ ). Daha sonra, her iki patologun saptadığı skorların ortalaması alınarak ve matematiksel kurallara göre en yakın tam sayıya yuvarlama yapılarak, istatistiksel çalışmaya esas teşkil edecek skor değerleri elde edildi.

### **İstatistiksel Değerlendirme**

İstatistik çalışmaları SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 13.0 for Windows programı kullanılarak yapıldı. Farklılık hesaplamalarında paired samples t-test, korelasyon hesaplamalarında Pearson korelasyon testi ve sağkalım istatistiklerinde Kaplan-Meier testi kullanıldı

## BULGULAR

Bu çalışmada sekiz senelik süre içerisinde tanı alan toplam 50 CLL/SLL olgusu kemik iliği infiltrasyon paterni yanı sıra ZAP-70, CD38, Fas ve Fas ligand ekspresyonu açısından incelendi. Ayrıca bu parametrelerin 2-88 aylık (ort.  $23.68 \pm 19.63$ ) izlem süresi içerisinde sağkalım ile ilişkileri araştırıldı.

### Demografik veriler

Olguların on yıllara göre yaş ve cinsiyet dağılımı Tablo 1’de, yukarıda belirtilen parametreler açısından dökümü ise Tablo 2’de sunulmaktadır. Olguların en genci 49, en yaşlısı 82 yaşında idi (ort.  $64.82 \pm 9.71$ ). En büyük olgu grubunun altıncı ve sekizinci on yıllarda bulunduğu görüldü. Olguların 21’i kadın, 29’u erkekti.

Tablo 1. Olguların yaş ve cinsiyet dağılımı

ONYIL	OLGU SAYISI		TOPLAM	TOPLAM (%)
	Kadın	Erkek		
40-49	0	1	1	2
50-59	7	9	16	32
60-69	4	9	13	26
70-79	9	8	17	34
80-89	1	2	3	6
TOPLAM	21(%42)	29 (58%)	50	100

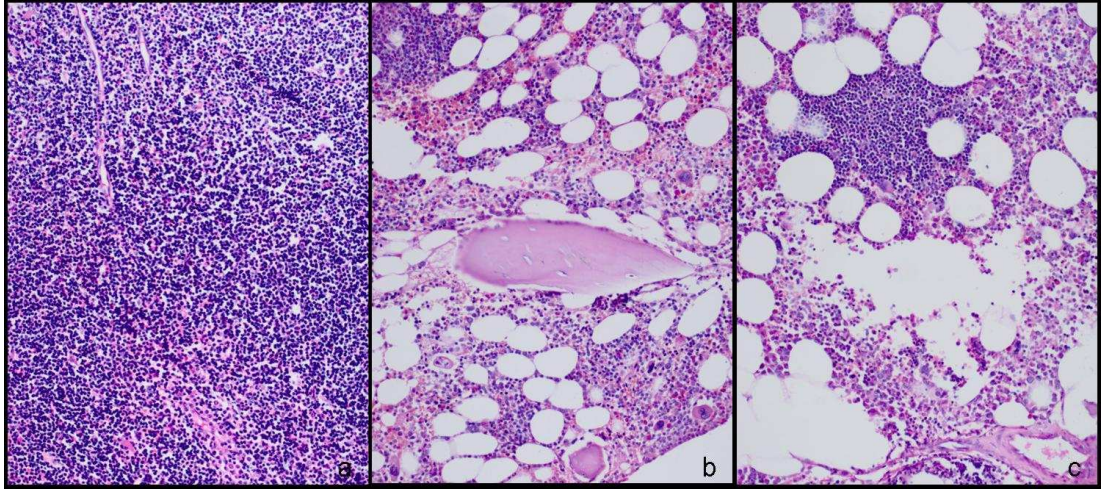
Tablo 2. Olguların tüm parametrelere göre dökümü

Olgu	K/E	Yaş	Patern	Tedavi	Prognoz	ZAP-70 skoru	CD38 skoru	Fas skoru	Fas L skoru
1	E	57	Diffüz	Kemoterapi	Ex	1	0	0	0
2	E	54	Diffüz	Kemoterapi	Remisyon	0	0	3	0
3	E	77	Diffüz	Kemoterapi	Remisyon	2	0	2	0
4	E	57	Diffüz	Kemoterapi	Remisyon	1	0	2	0
5	E	80	Diffüz	?	?	0	0	3	1
6	K	56	İnterstisiyel	ø	Remisyon	1	0	0	1
7	E	73	İnterstisiyel	Kemoterapi	Remisyon	1	1	2	0
8	E	63	Nodüler	Kemoterapi	Remisyon	2	1	2	2
9	K	72	İnterstisiyel	Kemoterapi	Remisyon	3	2	2	1
10	K	67	İnterstisiyel	Kemoterapi	Remisyon	3	0	3	1
11	K	82	İnterstisiyel	ø	Remisyon	3	0	3	1
12	K	62	İnterstisiyel	Kemoterapi	Remisyon	2	0	2	0
13	K	58	İnterstisiyel	ø	Remisyon	1	0	1	0
14	K	52	İnterstisiyel	Kemoterapi	Remisyon	0	0	3	1
15	E	73	Nodüler	ø	Remisyon	0	0	3	0
16	K	77	Diffüz	Kemoterapi	Remisyon	0	0	2	0
17	K	63	Nodüler	Kemoterapi	Ex	2	0	1	1
18	K	74	İnterstisiyel	Kemoterapi	Ex	3	0	3	0
19	E	60	İnterstisiyel	ø	Remisyon	2	0	2	1
20	E	76	İnterstisiyel	Kemoterapi	Ex	1	0	2	0
21	E	62	Nodüler	ø	Remisyon	1	0	2	1
22	E	63	Diffüz	?	?	0	0	2	0
23	K	52	Nodüler	?	?	0	0	3	0
24	K	72	Nodüler	Kemoterapi	Remisyon	1	0	3	0
25	K	72	Diffüz	?	?	0	0	3	0
26	K	61	Diffüz	?	?	1	0	2	1
27	E	49	Nodüler	ø	Remisyon	0	0	2	0
28	K	54	Nodüler	Kemoterapi	Remisyon	1	0	3	0
29	E	50	İnterstisiyel	Kemoterapi	Remisyon	1	0	3	0
30	K	79	Diffüz	Kemoterapi	Remisyon	2	0	3	1
31	E	53	Nodüler	Kemoterapi	Remisyon	3	0	1	0
32	K	73	İnterstisiyel	ø	Remisyon	0	0	1	0
33	E	57	Nodüler	Kemoterapi	Remisyon	0	0	3	0
34	E	77	Diffüz	?	?	0	0	1	0
35	K	68	Nodüler	Kemoterapi	Remisyon	0	0	3	1
36	E	74	İnterstisiyel	?	?	1	0	2	0
37	E	80	İnterstisiyel	Kemoterapi	Remisyon	0	0	3	1
38	E	76	Diffüz	?	?	1	0	3	2
39	E	70	İnterstisiyel	?	?	1	0	2	1
40	K	53	İnterstisiyel	Kemoterapi	Remisyon	2	0	3	2
41	E	60	İnterstisiyel	?	?	0	0	3	1
42	E	54	Diffüz	?	?	0	0	3	0
43	E	64	Diffüz	Kemoterapi	Remisyon	1	0	3	1
44	E	53	Diffüz	?	?	1	3	2	0
45	E	52	İnterstisiyel	?	?	1	0	3	3
46	K	54	Nodüler	?	?	0	0	3	1
47	K	73	Diffüz	?	?	0	0	2	0
48	E	62	Nodüler	?	?	3	3	2	1
49	E	73	İnterstisiyel	?	?	2	3	2	3
50	E	68	Diffüz	?	?	3	2	2	2



### Kemik İliği Tutulum Paterni

Olguların 17'sinde (% 34) diffüz, 20'sinde (%40) interstisiyel ve 13'ünde (%26) nodüler tutulum gözlemlendi. Kemik iliği tutulum paternlerinin histopatolojik görünümü Resim 1'de ve olguların kemik iliği tutulum paternleri açısından dağılımı Tablo 3'de gösterildi.



Resim1: Kemik iliği tutulum paternleri: a) diffüz, b) interstisiyel ve c) nodüler tutulum.

Tablo 3. Olguların kemik iliği tutulum paternleri açısından dağılımı

PATERN	OLGU SAYISI	ORAN (%)
Diffüz tutulum	17	34
İnterstisiyel tutulum	20	40
Nodüler tutulum	13	26
TOPLAM	50	100

### İmmünohistokimyasal Boyanma Özellikleri

Ortalama boyanma skorları ZAP-70 için  $1.02 \pm 0.979$ , CD38 için  $0.30 \pm 0.814$ , Fas için  $2.28 \pm 0.809$  ve FasL için  $0.64 \pm 0.802$  olarak saptandı (Tablo 4). Paternler esas alınarak elde edilen boyanma skorları ortalamaları ise, diğer bazı parametrelerle birlikte Tablo 5'te verildi.

Tablo 4. Antikorların ortalama boyanma skorları  $\pm$  standart sapma

ANTİKOR	ZAP-70	CD38	Fas	Fas ligand
SKOR $\pm$ SS	1.02 $\pm$ 0.979	0.30 $\pm$ 0.814	2.28 $\pm$ 0.809	0.64 $\pm$ 0.802

Tablo 5. Kemik iliği tutulum paternlerine göre ortalama boyanma skorları ve diğer tanımlayıcı veriler

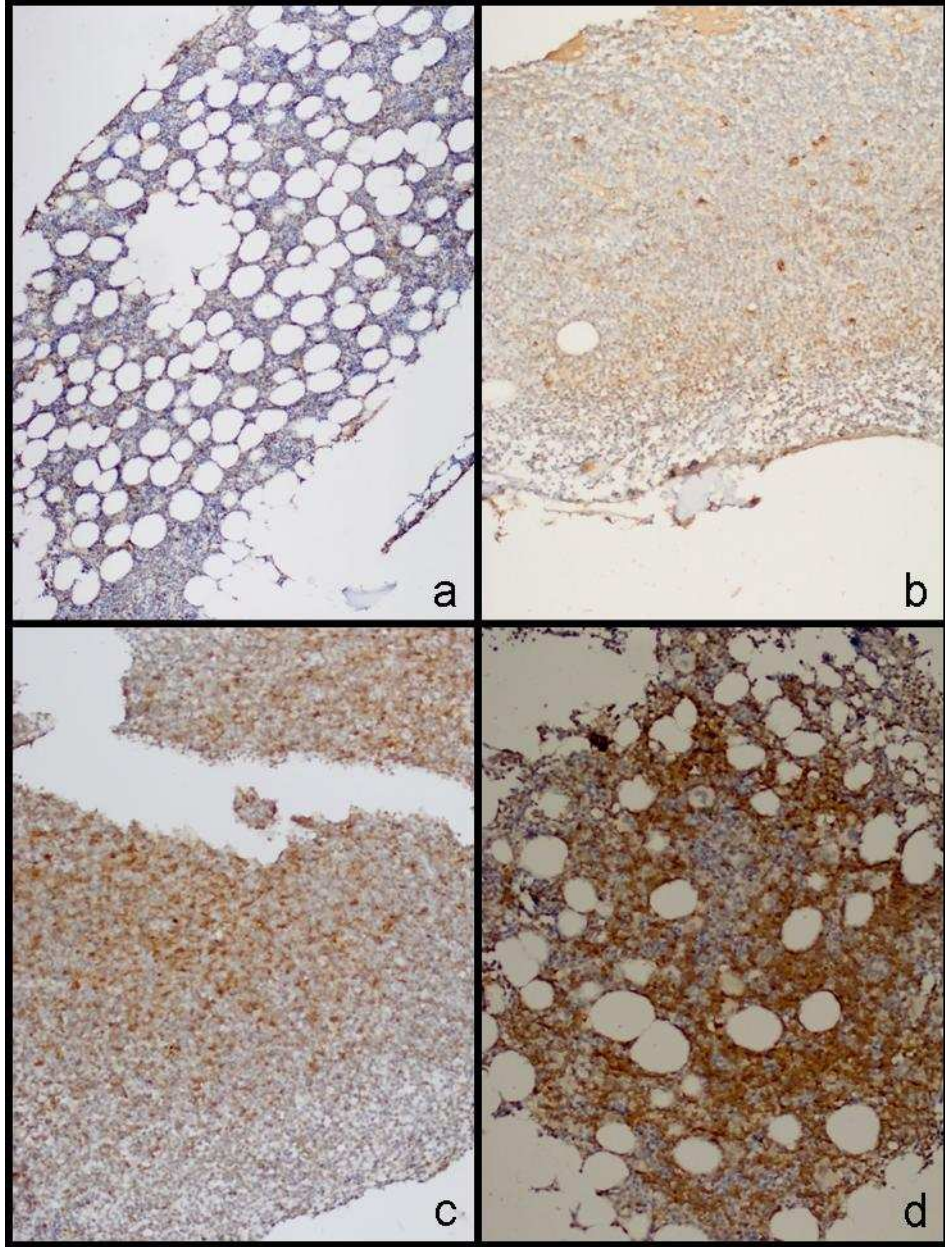
	Olgu sayısı	Ortalama yaş	Ortalama izlem süresi-ay	Ortalama ZAP-70 skoru	Ortalama CD 38 skoru	Ortalama Fas skoru	Ortalama FasL skoru
Diffüz	17	66.82	30.29	0.76	0.35	2.24	0.41
İnterstisiyel	20	64.75	21.20	1.35	0.30	2.30	0.85
Nodüler	13	62.83	28.77	1.00	0.46	2.38	0.62
TOPLAM	50	64.82	26.18	1.02	0.36	2.28	0.64

ZAP-70, CD38, Fas ve Fas L boyanma oranlarının karşılaştırmasında, boyanma oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (Tablo 6).

Tablo 6. Antikorların boyanma skorları arasındaki farklılıklar açısından karşılaştırılması sonucu elde edilen *P* değerleri (paired samples t-test)

ANTİKOR	ZAP-70	CD 38	Fas	Fas ligand
ZAP-70	X	<0.001	<0.001	0.013
CD 38	<0.001	X	<0.001	0.014
Fas	<0.001	<0.001	X	<0.001
Fas ligand	0.013	0.014	<0.001	X

İstatistiksel çalışmalarda, ZAP-70, CD38 ve FasL boyanma skorları arasında pozitif korelasyon saptanırken, Fas ile diğer üç belirleyici arasında korelasyon görülmedi (Tablo 7).



Resim 2: ZAP-70 ile boyanma oranları: a)  $<25\%$  pozitif, b) %25-50 pozitif, c) % 51-75 pozitif, d)  $>75\%$  pozitif.

Boyanma skorları dikkate alınarak yapılan istatistiksel değerlendirmede ZAP-70 ekspresyonunun (Resim 2) diffüz tutulumda, interstisiyel ve nodüler tutulumla göre anlamlı biçimde fazla olduğu saptandı (sırasıyla  $P= 0.029$  ve  $P=0.037$ , Tablo 8).

Tablo 7:Antikorların boyanma skorları arasındaki korelasyonu araştırmak için yapılan Pearson korelasyon testinden elde edilen *P* değerleri

ANTİKOR	ZAP-70	CD 38	Fas	Fas ligand
ZAP-70	X	0,002	0,262	0,023
CD38	0,002	X	0,368	0,021
Fas	0,262	0,368	X	0,272
Fas ligand	0,023	0,021	0,272	X

Tablo 8. ZAP-70 boyanma skorlarının kemik iliği tutulum paternlerine göre karşılaştırılmasından elde edilen *P* değerleri (paired samples t-test)

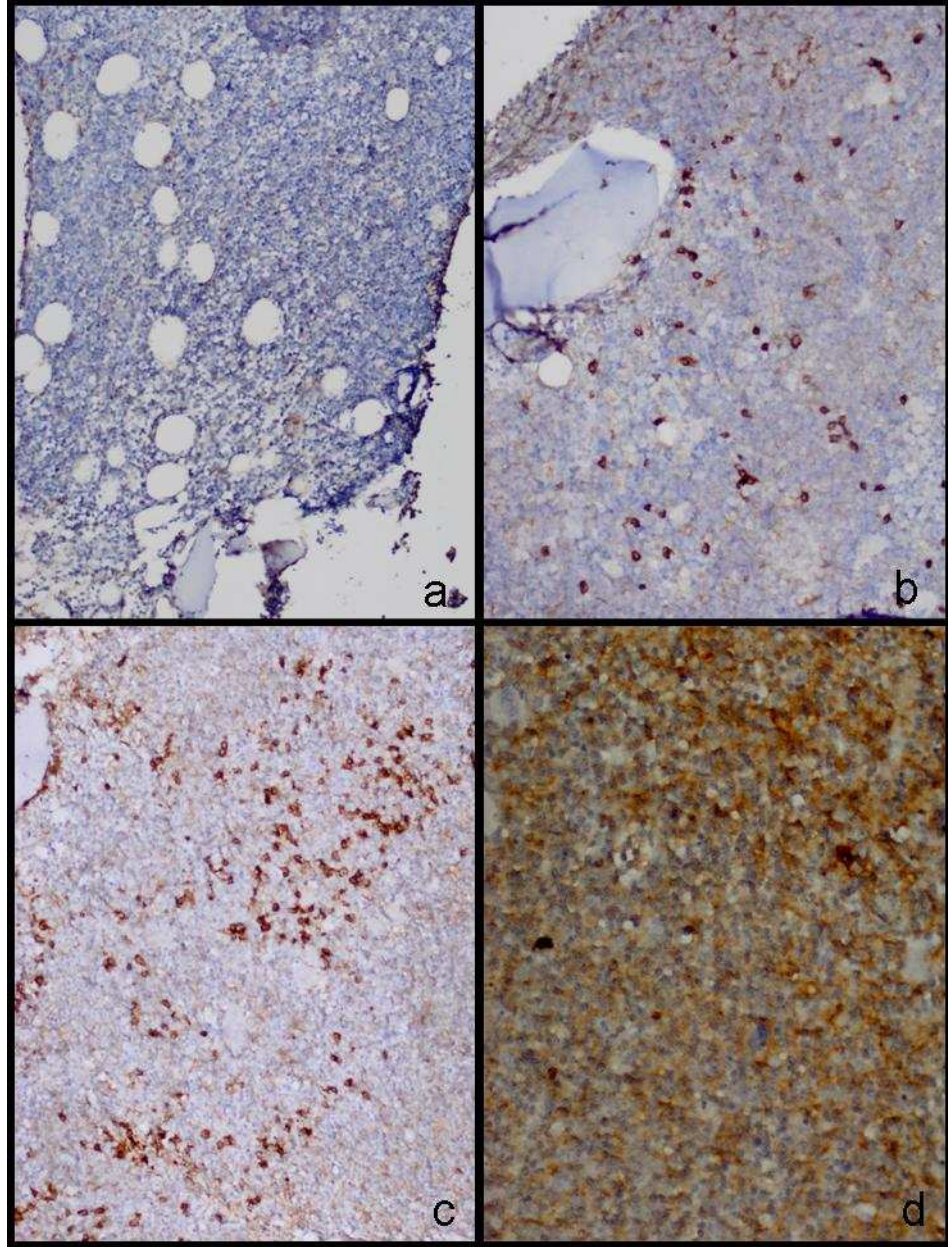
	Diffüz	İnterstisiyel	Nodüler
Diffüz	X	0.029	0.037
İnterstisiyel	0.029	X	0.327
Nodüler	0.037	0.327	X

Boyanma skorları dikkate alınarak yapılan istatistiksel değerlendirmede CD38 ekspresyonu (Resim 3) ile kemik iliği tutulum paternleri arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi ( $P>0.05$ , Tablo 9).

Tablo 9. CD38 boyanma skorlarının kemik iliği tutulum paternlerine göre karşılaştırılmasından elde edilen *P* değerleri (paired samples t-test)

	Diffüz	İnterstisiyel	Nodüler
Diffüz	X	0.548	0.111
İnterstisiyel	0.548	X	0.513
Nodüler	0.111	0.513	X

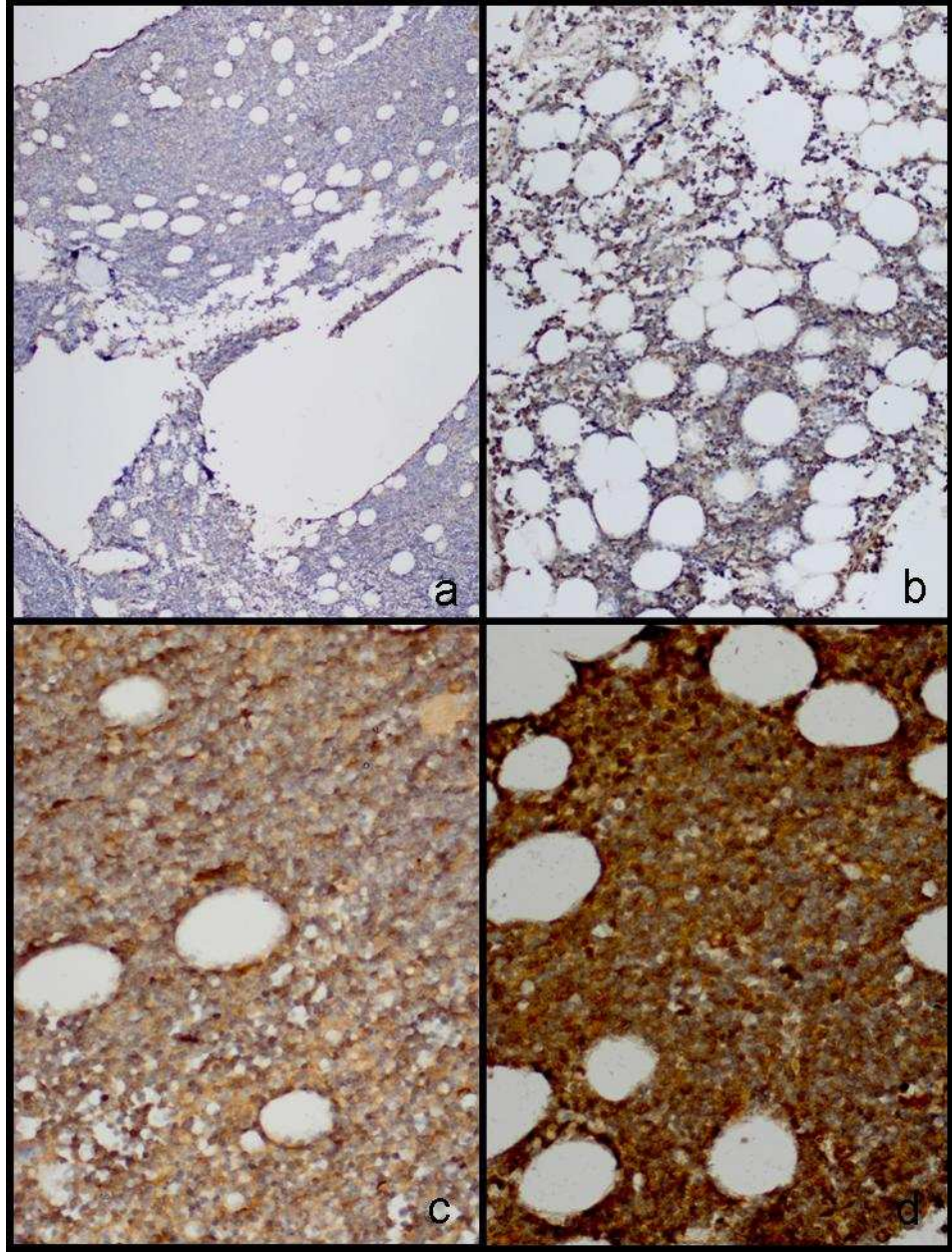
Boyanma skorları dikkate alınarak yapılan istatistiksel değerlendirmede Fas ekspresyonu (Resim 4) ile kemik iliği tutulum paternleri arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi ( $P>0.05$ , Tablo 10).



Resim 3: CD 38 boyanma oranları: a)  $<10\%$ , b) %11-20, c) %21-30, d)  $>30$

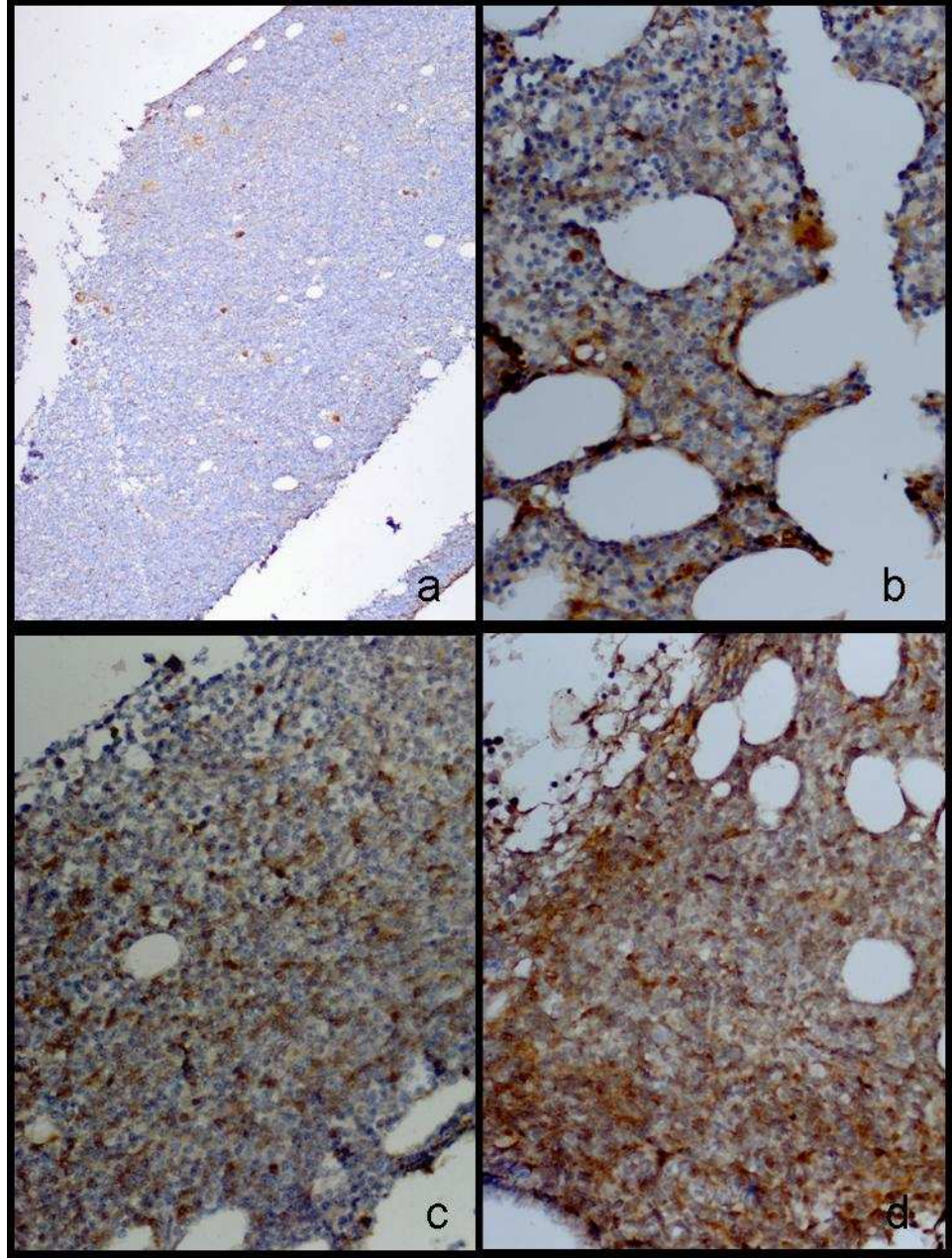
Tablo 10. Fas boyanma skorlarının kemik iliği tutulum paternlerine göre karşılaştırılmasından elde edilen  $P$  değerleri (paired samples t-test)

	Diffüz	İnterstisiyel	Nodüler
Diffüz	X	0.737	0.636
İnterstisiyel	0.737	X	0.461
Nodüler	0.636	0.461	X



Resim 4: Fas boyanma oranları: a)  $<25\%$  pozitif, b) %25-50 pozitif, c) % 51-75 pozitif, d)  $>75\%$  pozitif.

Boyanma skorları dikkate alınarak yapılan istatistiksel değerlendirmede FasL ekspresyonu (Resim 5) ile kemik iliği tutulum paternleri arasında da anlamlı bir ilişki gözlenmedi ( $P>0.05$ , Tablo 11).



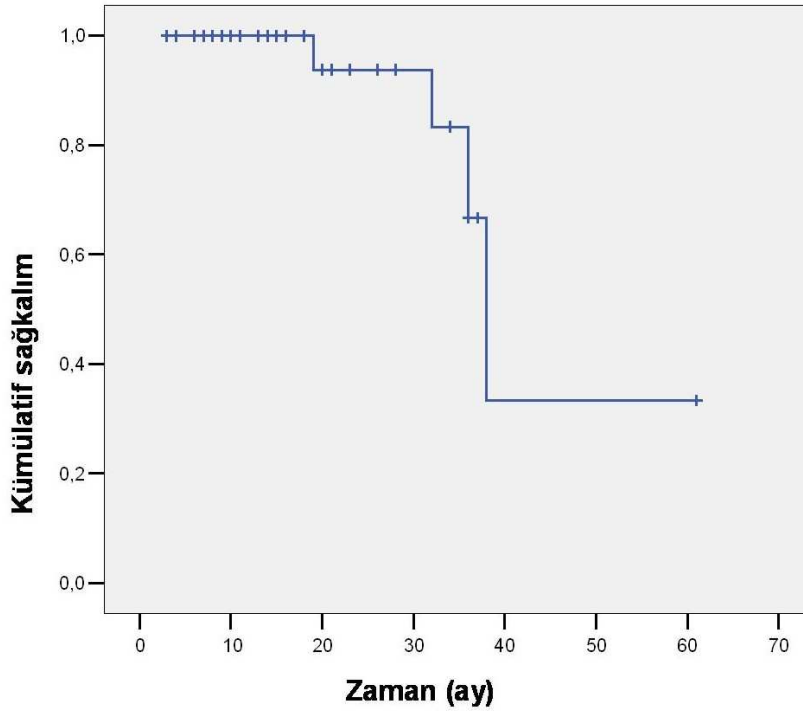
Resim 5: Fas ligand boyanma oranları: a)  $<10\%$  pozitif, b) %11-20 pozitif, c) %21-30 pozitif, d)  $>30\%$  pozitif.

Tablo 11. Fas boyanma skorlarının kemik iliği tutulum paternlerine göre karşılaştırılmasından elde edilen  $P$  değerleri (paired samples t-test)

	Diffüz	İnterstisiyel	Nodüler
Diffüz	X	0.422	0.427
İnterstisiyel	0.422	X	0.549
Nodüler	0.427	0.549	X

50 olgudan izlemleri eksiksiz olan 32 hasta üzerinde yapılan sağkalım analizlerinde ortalama sağkalım süresi  $43.521 \pm 6.169$  ay (%95 güvenlilik aralığı: 31.430-55.612 ay) olarak saptandı. 32 hastanın dördünün 19-32 ay arasında değişen sürelerde öldüğü görüldü (Şekil 1). İki kadın ve ikisi erkek olan bu hastaların yaşları 57-76 arası değişmekteydi. Biri diffüz, bir noduler ve kalan ikisi ise interstisyel kemik iliği tutulumu gösteren bu hastaların tümünün kemoterapi almış olmalarına karşın kaybedildikleri görüldü. Bu hastalar için elde edilen Zap-70, CD38, Fas ve FasL boyanma skorlarıyla ölüm arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi.

Şekil 1: Prognozları hakkında bilgi edinilebilen 32 olguda kümülatif sağkalım grafiği (Kaplan-Meier)





## TARTIŞMA

B hücreli CLL/SLL batı ülkelerinde en sık izlenen lösemi tipi olup, değişken klinik gidişe sahip lenfoid bir malignitedir (7, 10). Erkeklerde iki kat daha fazla görülen bu tümörün ortalama ortaya çıkış yaşı 65'tir (18). Çalışmamızda değerlendirilen 50 olgunun yaşları (ortalama  $64.82 \pm 9.71$ ) ve cinsiyetleri (%58 erkek, %42) genel olarak kaynakçayla uyumlu kabul edilebilir.

Ortalama yaşam süresinin yaklaşık on yıl olduğu belirtilen bu hastalıkta prognoz bireyden bireye farklılıklar göstermektedir (4). Bazı hastalar sessiz ve progresyon göstermeyen bir klinik ve uzun sağkalım süresine sahip iken, hızlı ilerleyen klinik özellikler ve erken tedavi gerektiren oldukça agresif seyirli hasta grubunun da olması dikkat çekicidir (2, 3, 5, 6). Rai ve Binet evreleme sistemleri yanı sıra lenfosit katlanma zamanı, serum  $\beta 2$  mikroglobulin düzeyi, çözünür CD23, serum timidin kinaz, kemik iliği histolojisi ve sitogenetik anomaliler gibi parametreler prognostik belirleyiciler olarak kullanılmaktadır. Ancak bu parametreler özellikle erken evredeki CLL/SLL olgularında, stabil veya progresif formları ayırmakta yetersiz kalmaktadır. (11, 13)

Ig ağır zincir değişken bölge somatik mutasyonunun varlığı veya yokluğu CLL/SLL'nin iki alt grubunu belirlemede kullanılacak en güvenilir prognostik faktördür. IgV<sub>H</sub> gen mutasyonu bulduran olguların prognozu iyi olup tedavi gerektirmezler. Mutasyonsuz IgV<sub>H</sub> gen bulduran olgularda ise sağkalım süresi ve tedaviye yanıt azalmıştır (3, 6, 37). IgV<sub>H</sub> mutasyon analizinin rutin laboratuvarında kullanımının oldukça zor ve pahalı olması, mutasyonun varlığını/yokluğunu gösterebilecek yeni tetkikler bulma gereksinimini doğurmuştur (10, 13). Zupo ve arkadaşları CLL/SLL

hastalarının lenfositlerdeki CD38 ekspresyonu temelinde alt gruplara ayrılabilirliğini rapor etmişlerdir (38). Damle ve arkadaşları çalışmalarında yüksek CD38 ekspresyonu gösteren CLL/SLL hastalarında IgV<sub>H</sub> mutasyonu bulunmadığını, düşük düzeylerde CD38 ekspresyonu gösterenlerde ise IgV<sub>H</sub> mutasyonu ve iyi prognoz arasında korelasyon bulunduğunu saptamışlar ve CD38'in CLL/SLL'de IgV<sub>H</sub> mutasyonel durumu yerine kullanılabilir bir belirleyici olarak kullanılabilirliğini öngörmüşlerdir (39). CD38'in bu prognostik değeri diğer yazarlar tarafından da konfirme edilmektedir (8, 11). Ayrıca Chevallier ve arkadaşları lösemik hücrelerdeki CD38 ekspresyonunun hastalık sürecinde değişkenlik gösterebileceğini öne sürmüştür (40). İbrahim ve arkadaşlarının 218 olguluk çalışmalarında flow sitometrik olarak %20 veya daha çok malign hücrede CD38 ekspresyonu gözlenen olgularda prognozun kötü ve %20'den daha az hücrede CD38 ekspresyonu izlenen olgularda ise prognozun iyi olduğu bulunmuş ve buna dayanarak CLL/SLL olgularının prognostik olarak iki farklı alt gruba bölünebileceği savlanmıştır (41). Morabito ve arkadaşları ise, %30 üzerinde CD38 ekspresyonu gözlenen olguların, IgV<sub>H</sub> mutasyonsuz konfigürasyonu ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (9). CD38 ekspresyon pozitifliği, CLL/SLL'deki diğer negatif prognostik belirleyiciler ile korelasyon göstermektedir. Bunlar ZAP-70, sitogenetik anomaliler, çözümlü CD23, çözümlü β2 mikroglobulin, p53 fonksiyonu ve hücre boyutudur (30). Domingo-Domenech ve arkadaşları CD38 pozitifliği gösteren hastaların, CD38 negatif hastalara göre daha sık tedavi gereksinimi olduğunu saptamışlardır (42). Ayrıca Ottagio ve arkadaşları CD38 ekspresyonu ile kompleks sitogenetik anormallikler arasında korelasyon bulunduğunu bildirmişlerdir (43).

Son zamanlarda ZAP-70'in IgV<sub>H</sub> mutasyon durumu yerine kullanılabilirliği, agresif klinik gidiş gösterecek hastaları belirlemede yardımcı olabileceği üzerinde de durulmaktadır (2, 44). Normalde B lenfositlerde eksprese edilmeyen bu belirleyici, CLL/SLL hücrelerinde saptanmıştır. ZAP-70 yalnızca IgV<sub>H</sub> mutasyonel durum belirleyicisi değil, aynı zamanda prognostik faktör olarak da yardımcıdır ve hastalık süresince ekspresyonunun stabil olduğu bildirilmiştir (7, 45). İmmunohistokimyasal veya

flow sitometrik olarak, %20 veya daha fazla lösemik hücrede ZAP-70 pozitifliği gösteren olguların mutasyonsuz IgV<sub>H</sub> gen ile ilişkili olduğu, IgV<sub>H</sub> gen mutasyonu izlenen olgularda ise %20'den az lösemi hücresinde ZAP-70 ekspresyonu saptanan çalışmalar bulunmaktadır (7). Wiestner ve arkadaşları Western blot, RT-PCR ve immunohistokimyasal olarak saptanan ZAP-70 ekspresyon düzeylerinin IgV<sub>H</sub> mutasyonel durumunun çok iyi bir belirleyicisi olduğunu söylemektedirler (46). Durig ve arkadaşları ZAP-70 pozitif hastaların, negatiflere göre yoğun kemoterapi gereksindiklerini bildirmişlerdir (47). Hus ve arkadaşları 156 olguluk serilerinde ZAP-70 ekspresyonunun tedavinin gerekli görüldüğü hastalarda, tedavi görmeyenlerden daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir (7). Rosenwald ve arkadaşları çalışmalarında mutasyonsuz IgV<sub>H</sub>'li CLL hastalarında ZAP-70 aşırı ekspresyonu gözlemişlerdir (48). Diğer serilere göre oldukça yüksek olmakla birlikte, Orchard ve arkadaşları ZAP-70 pozitif CLL/SLL hastalarında ortalama yaşam süresinin 9.3 yıl, negatif hastalarda ise 24.4 yıl olduğunu bildirmişlerdir (2).

Görüldüğü gibi, ZAP-70 aşırı ekspresyonu bağımsız negatif prognostik faktör olup, CD38 ekspresyonu ve IgV<sub>H</sub> gen mutasyon yokluğu ile koreledir (49). CD38 ve ZAP-70 ekspresyonunu değerlendirmek, IgV<sub>H</sub> mutasyonel durumunu belirlemekten daha ucuz ve zaman kazandırıcı bir yöntemdir. CLL/SLL'de flow sitometrik ZAP-70 ve CD38 kombine analizinin yapıldığı bir çalışmada, uniform negatif (CD38 negatif, ZAP-70 negatif) sonuç veren hastalarda iyi prognoz, uniform pozitif (CD38 pozitif, ZAP-70 pozitif) sonuç veren hastalarda kötü prognoz ve uyumsuz (CD38 pozitif, ZAP-70 negatif veya CD38 negatif, ZAP-70 pozitif) sonuç veren hastalarda da intermediate prognoz sergilendiği bildirilmektedir (5). D'Arena ve arkadaşları 157 olguluk flow sitometrik çalışmalarında her iki belirleyicinin de kötü klinik ve biyolojik özellikler ile korele olduklarını, ZAP-70 ve CD38 pozitif olguların, negatif olgulara göre daha kısa tedavisiz dönem geçirdiklerini ve hızlı ilerlediklerini öne sürmüşler, ayrıca ZAP-70'in CD38 ve mutasyonel durumdan daha güçlü bir belirleyici olduğunu ve kötü klinik gidişi belirlemede bu iki belirleyicinin kombinasyonunun, yalnız ZAP-70 veya CD38'den daha kullanışlı olduğu yönünde görüş bildirmişlerdir (5). Bizim çalışmamızda da bu iki belirleyici bir

arada kullanılmış ve ZAP-70 ekspresyonu ile CD38 ekspresyonu arasında anlamlı bir paralellik saptanmıştır ( $P=0.002$ ).

CLL/SLL'de kemik iliği biopsi materyalinde lenfoid infiltrasyonun histolojik paterninin prognostik faktör olabileceği söylenmektedir. Diffüz infiltrasyon paternini kötü prognoz, diffüz olmayan (interstisiyel ya da nodüler) infiltrasyon paternini ise iyi prognozla ilişkilendiren çalışmalar bulunmaktadır. Schade ve arkadaşları 35 olguluk çalışmalarında kemik iliğinde diffüz infiltrasyon gösteren lösemi hücrelerinde güçlü ZAP-70 boyanması saptamışlar, nodüler tutulum gözlenen olguların ZAP-70 negatif olduğunu gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmada diffüz tutulumlu olgularda IgV<sub>H</sub> mutasyonu bulunmadığı, non-diffüz tutulumlarda ise IgV<sub>H</sub> mutasyonu izlendiği saptanmıştır (12). Çalışmamızdaki olguların %40'ı interstisiyel tutulum, %34'ü diffüz tutulum ve %26'sı nodüler tutulum sergilemekte olup ZAP-70 ekspresyonunun diffüz tutulum gösteren olgularda, nodüler ve interstisiyel tutulum gösteren olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha fazla (sırasıyla  $P=0.037$ ,  $P=0.029$ ) olduğu saptanmıştır. Kaynakçada CD38, Fas ve Fas L ile kemik iliği tutulum paternleri arasındaki ilişkiyi araştıran immunohistokimya temelli her hangi bir çalışmaya rastlanmazken, bizim çalışmamızda böyle bir ilişkiyi ortaya koyacak bulgular elde edilememiştir.

Kaynakçada CLL/SLL'de Fas ve Fas L ekspresyonu ile ilgili yayınlar da oldukça azdır. Fas çalışmalarının büyük kısmı da serumdaki çözünebilir Fas ile yapılmıştır. CLL/SLL olgularında yüksek Fas düzeyleri lenfadenopati, splenomegali ve kısa sağkalım süresi ile korele olup bunun nedeninin apoptozisin blokajı olduğu açıktır (11). Bu durumun Fas ve FasL'in T hücreleri apoptozise götürmeleri sonucu bu hücrelerin tümör hücrelerinin çoğalması üzerindeki baskılayıcı etkilerinin ortadan kalkması sonucunda geliştiği düşünülmektedir. Groneberg ve arkadaşları çalışmalarında CLL/SLL hastalarının periferik kan T hücrelerindeki Fas ekspresyon düzeyinde artışın, kötü prognoz ile korelasyon gösterdiğini gözlemlemişlerdir (14). T hücrelerinde Fas upregulasyonu, T hücre reseptörü ve sitokin bağımlı stimülasyondan sonra gözlenir. T hücrelerdeki Fas ekspresyonu artışının, CLL/SLL sonucunda gelişen immun yetmezlikten kaynaklanan kronik

infeksiyonların sürekli stimülasyonu ile görülebileceği ve dolayısıyla hastalık progresyonunun bir işareti olabileceği öne sürülmüştür (14). Benzer çıkarımlar, Fas'ın etkinleşebilmesi için şart olan FasL için de yapılabilir. Bizim çalışmamızda ZAP-70 ve Fas ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki elde edilememesine karşın, Fas L ekspresyonu ile ZAP-70 ve CD38 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı paralellik saptanmıştır (sırasıyla  $P=0.023$ ,  $P=0.021$ ). ZAP-70 ve CD38 ile FasL ekspresyonu arasında anlamlı bir benzerlik olmasına karşın Fas ekspresyonu ile bu benzerliğin bulunamamasının önemli bir nedeni Fas ekspresyonunun immunohistokimyasal açıdan değerlendirilmesinde karşılaşılan zorluk olabilir. Bu belirleyici ile epitelial tümörlerde yapılan çalışmalarda membranöz boyanmanın dikkate alındığı bilinmesine karşın, bizim çalışmamızda değerlendirdiğimiz CLL/SLL hücrelerinde membranöz/sitoplazmik ya da yalnızca sitoplazmik bir boyanma görülmesi nedeniyle değerlendirmenin sağlıklı olmayabileceği düşüncesi uyanmıştır. Fas ile CLL/SLL'de yapılmış immunohistokimyasal çalışmaların olmaması, boyanmanın nasıl değerlendirilmesi gerektiği konusunda güçlük çıkarmaktadır. Bu konuda ileride yapılabilecek çalışmalar, soruna ışık tutabilir.

İzlemleri eksiksiz olan 32 hasta üzerinde yapılan sağkalım analizlerinde ortalama sağkalım süresi olarak saptadığımız  $43.521 \pm 6.169$  ay (%95 güvenlilik aralığı: 31.430-55.612 ay) kaynakçada bildirilenlerden daha az görünmektedir. Bu durum serimizdeki sayının azlığı ve ölen hastaların görece çokluğundan kaynaklanıyor olabilir. Benzer biçimde, ölen hastalarda çalışmanın geneline aykırı olarak yalnızca bir hastada diffüz tutulum paterninin görülmesi yanı sıra düşük ZAP-70, CD38 ve FasL ekspresyonu/yüksek Fas ekspresyonunun bulunması da olgu sayısındaki azlık nedeniyle rastlantısal olarak değerlendirilebilir.

## SONUÇ ve ÖNERİLER

CLL/SLL erişkinler içinde en sık görülen lösemi tipidir. Olguların bir kısmı sessiz bir gidiş sergilerken, oldukça uzun bir sağkalım süresi vardır. Bir kısım olguda ise hızlı ilerleyen klinik gidiş sonucu sağkalım süresi daha kısa olduğundan erken tedavi gereklidir. Bu durum hastalığın prognozunu belirlemek için kullanılacak parametrelerin geliştirilmesine neden olmuş ve en önemli prognostik belirleyicinin IgV<sub>H</sub> mutasyonel durumu olduğu sonucuna varılmıştır. Oldukça zahmetli ve masraflı bir yöntem olan IgV<sub>H</sub> mutasyon analizi yerine kullanılabilecek ZAP-70 ve CD38 gibi belirleyiciler yavaş yavaş rutindeki yerlerini almaya başlamıştır.

Bu çalışmada CLL/SLL'de prognostik belirleyici olarak kullanılabilecek ZAP-70 ve CD38 proteinleri ile apoptozisi indükleyen ve söz konusu tümörde kötü prognostik indikatör olduğuna ilişkin kuşkular bulunan Fas ve bunun ligandı olan FasL arasındaki olası ilişkiler ve bunların ekspresyonunun kemik iliği tutulum paternleri ile bağlantısı olup olmadığı araştırılmıştır.

IgV<sub>H</sub> mutasyon durumunun en iyi belirleyicisi olarak kabul edilen ZAP-70 ekspresyonu ile CD38 ve FasL ekspresyonları arasında anlamlı paralellik saptanmış (sırasıyla  $P=0.002$ ,  $P=0.023$ ); ayrıca, CD38 ekspresyonu ile FasL ekspresyonu arasında da anlamlı bir pozitif korelasyon bulunmuştur ( $P=0.023$ ). Fas ekspresyonu ile diğer üç belirleyicinin ekspresyonları arasında ise ilişki kurulamamıştır. Diffüz infiltrasyonun gözlendiği olgularda nodüler ve interstisiyel infiltrasyonun izlendiği olgulara göre ZAP-70 ile daha yoğun boyanma dikkati çekmiştir (sırasıyla  $P=0.037$  ve  $P=0.029$ ).

Bulgularımız CLL/SLL'de prognostik belirleyici olarak rutinde yavaş yavaş kullanılmaya başlanan ZAP-70 ve CD38'e FasL'ın da eklenebileceğini, ayrıca kemik iliği tutulum paterninin de dikkate alınmaya devam edilmesinin gerekli olduğunu desteklemektedir.

## ÖZET

Bu çalışma, CLL/SLL'de hızlı progresyon ve agresif gidişle ilişkileri son yıllarda çeşitli çalışmalarla belirlenen zeta associated protein-70 (ZAP-70) ve CD38 proteinleri ile apoptozisi indükleyen ve söz konusu tümörde kötü prognostik indikatör olduğuna ilişkin kuşkular bulunan Fas ve bunun ligandı olan Fas ligand (FasL) arasındaki olası ilişkileri değerlendirmek ve bunların ekspresyonunun kemik iliği tutulum paternleri ile bağlantısı olup olmadığını ortaya koymak amacıyla planlanmıştır.

Sekiz yıllık süre içinde kemik iliği biopsisinde CLL/SLL tanısı konan ve tanıları akım sitometriyle doğrulanan 50 olgunun kemik iliği biopsi materyallerinin parafin bloklarından elde edilen kesitlere avidin-biotin peroksidaz yöntemiyle ZAP-70, CD38, Fas ve FasL antikorları uygulanmıştır. Tümör hücrelerinin her bir antikorla boyanma oranları çift-kör semi-kantitatif bir yöntemle saptanarak birbirleriyle karşılaştırılmış; her bir antikor ise kendi içinde kemik iliği tutulum paternleri (diffüz, interstisiyel, noduler) açısından değerlendirilmiştir.

Kötü prognostik belirleyici oldukları yaygın olarak kabul edilen ZAP-70 ve CD38'in tümör hücrelerince ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir paralellik ( $P=0.002$ ) bulunmuş; benzer bir paralellik bu iki belirleyici ile FasL arasında da saptanmıştır (sırasıyla  $P=0.023$  ve  $P=0.021$ ). Fas ekspresyonu ile diğer üç belirleyici arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. Kemik iliği tutulum paternleri açısından ise, ZAP-70 ekspresyonunun diffüz tutulumda interstisiyel ve noduler tutulumu göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde fazla olduğu saptanmıştır (sırasıyla  $P=0.029$  ve  $P=0.037$ ). Diğer belirleyicilerle, kemik iliği tutulum paterni ile boyanma oranı arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir.

CLL/SLL'de ZAP-70 ve CD38 ekspresyonlarının kötü prognostik belirleyiciler oldukları kabul edilmek kaydıyla, artmış FasL ekspresyonunun da ek bir negatif prognostik parametre olarak kullanılabilmesi ve kemik iliğinde diffüz CLL/SLL infiltrasyonunun kötü prognoz belirtisi olarak dikkate alınmaya devam edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

## SUMMARY

This study is planned to evaluate the possible relationship between zeta associated protein-70 (ZAP-70) and CD38 proteins, those which are concerned with rapid progression and aggressive clinical course in chronic lymphocytic leukemia / small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL); and Fas and its ligand Fas ligand (FasL), which induct apoptosis and are suspected to be poor prognostic indicators in that tumor.

By avidine-biotin peroxidase method, ZAP-70, CD38, Fas and FasL antibodies were applied to sections obtained from paraffin blocks of bone marrow biopsy materials of 50 patients, who were diagnosed as CLL/SLL in 8-years time period and whose diagnoses were confirmed by flow cytometry. The ratio of stained tumor cells with each antibody were calculated by using a double-blind semi-quantitative method and compared with each other; and each antibody was evaluated according to bone marrow infiltration patterns of the tumor, i. e., diffuse, İnterstisiyel and nodular.

A statistically significant positive correlation ( $P=0.002$ ) was found between expressions of ZAP-70 and CD38, which are generally considered to be poor prognostic predictors and a similar correlation was obtained between these two markers and FasL ( $P=0.023$  and  $P=0.021$ , respectively). No statistically significant results were established between Fas expression and the other three markers. In bone marrow infiltration aspect, statistically significant more ZAP-70 expression is found in diffuse infiltration pattern in comparison to İnterstisiyel and nodular patterns ( $P=0.029$  and  $P=0.037$ , respectively), confirming the negatif prognostic effect of diffuse infiltration. With other markers, no remarkable results were obtained between infiltration patterns and staining ratio.

Since ZAP-70 and CD38 overexpressions are accepted as poor prognostic predictors in CLL/SLL, it is concluded that increased FasL expression can be used as an additional negative prognostic parameter. New studies with larger series are needed to confirm this conclusion.



## KAYNAKÇA

1. Ghia P, Ferreri AJM, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 64: 234-246.
2. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet* 2004; 363: 105-111.
3. Chaar BT, Schergen AK, Grosso LE. Discordance of ZAP-70 in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Int J Lab Hematol* 2008; 30: 36-40.
4. Bojarska-Junak A, Rolinski J, Kawiak J. Modification of immunocytochemical ZAP-70 assay for potential clinical application in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Folia Histochem Cytobiol* 2005; 43 (1): 19-23.
5. D'Arena G, Tarnani M, Rumi C, Vaisitti T, Aydin S, et al. Prognostic significance of combined analysis of ZAP-70 and CD38 in chronic lymphocytic leukemia. *Am j Hematol* 2007; 82: 787-791.
6. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rai KR, Weiss A, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100 (13): 4609-4614.
7. Hus I, Podhorecka M, Bojarska-Junak A, Rolinski J, Schmitt M, et al. The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol* 2006; 17: 683-690.
8. Danilov AV, Klein AK, Lee HJ, Velez Baez D, Huber BT. Differential control of G<sub>0</sub> programme in chronic lymphocytic leukemia: a novel prognostic factor. *Br J Haematol* 2005; 128: 427-481.
9. Morabito F, Mangiola M, Oliva B, Stelitano C, Callea V, et al. Peripheral blood CD38 expression predicts survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2001; 25: 927-932.

10. Hayat A, O'Brien D, O'Rourke P, McGuckin S, Fitzgerald T, et al. CD38 expression level and pattern of expression remains a reliable and robust marker of progressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2006; 47 (11): 2371-2379.
11. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, Buccisano F, Epiceno AM, et al. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98 (9): 2633-2639.
12. Schade U, Oliver B, Vornhusen S, Jager A, Büsche G, et al. 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. *Hum Pathol* 2006; 37: 1153-1161.
13. Bojarska-Junak A, Giannopoulos K, Kowal M, Dmoszynska A, Rolinski J. Comparison of methods for determining zeta-chain associated protein-70 (ZAP-70) expression in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70B: 293-301.
14. Groneberg C, Pickartz T, Binder A, Ringel F, Srock S, et al. Clinical relevance of CD95 (Fas/APO-1) on T cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Exp Hematol* 2003; 31: 682-685
15. Osorio LM, Aguilar-Santelises M, De Santiago A, Hachiya T, Mellstedt H, et al. Increased serum levels of soluble Fas in progressive B-CLL. *Eur J Haematol* 2001; 66: 342-46.
16. Dores GM, Anderson WF, Curtis RE, Landgren O, Ostroumova E et al. Chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br J Haematol* 2007; 139: 809-819.
17. Ben Ezra J. Small Lymphocytic Lymphoma. In: Knowless DM ed. *Neoplastic Hematopathology*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 773-787.
18. Müller Hermelink HK, Montserrat E, Catovsky D, Harris NL. Chronic Lymphocytic Leukemia/ Small Lymphocytic Lymphoma. In: Jaffe ES,

- Haris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization classification of Tumours. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Pres; 2001. p. 127-130.
19. Hsi ED. B-Cell Leukemias of Mature Lymphocytes. In: Hsi ED ed. Hematopathology. Philadelphia: Elsevier; 2007. p. 367-375.
  20. Foucar M.K. Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocytic Leukemia. In: Knowless DM ed. Neoplastic Hematopathology. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins; 2001. p. 1505-1529.
  21. Dighiero G, Hamblin T. J. Chronic lymphocytic leukemia. Lancet 2008; 371:1017-1029.
  22. Kay NE, Hamblin TJ, Jelinek AF, Dewald GW, Byrd JC, et al. Chronic lymphocytic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2002; 193-213.
  23. Asaad NY, El-Wahed MMA, Dawoud MM. Diagnosis and prognosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (B-CLL/SLL) and mantle cell lymphoma (MCL). J Egypt Natl Canc Inst 2005; 17 (4): 279-290.
  24. Amin S, Parker A, Mann J. ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia. Int J Biochem Cell Biol 2007: 1-5.
  25. Hamblin TJ. ZAP-70 levels do change in CLL but not very often. Leuk Lymphoma 2007; 48 (16): 1059-60.
  26. Sup JS, Domiati-Saad R, Kelley TW, Steinle R, Zhao X, et al. ZAP-70 expression in B-cell hematologic malignancy is not limited to CLL/SLL. Am J Clin Pathol 2004; 122: 582-587.
  27. Carrearas J, Villamor N, Colomo L, Moreno C, Cajal SR, et al. Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in B-cell lymphoid neoplasms. J Pathol 2005; 205: 507-513.
  28. Montserrat E. New prognostic markers in CLL. Hematology 2006; 279-284.
  29. Matrai Z. CD38 as a prognostic marker in CLL. Hematology 2005;10 (1): 39-46.

30. Deaglio S, Aydin S, Vaisitti T, Bergui L, Malavasi F. CD38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target. *Trends Mol Med* 2008; 14 (5): 210-18.
31. Kokkonen TS, Augustin MT, Makinen JM, Kokkonen J, Karttunen TJ. High endothelial venules of the lymph nodes express Fas ligand. *J Histochem Cytochem* 2004; 52 (5): 693-699.
32. Rzeszutko M, Rzeszutko W, Dziegiel P, Balcerzak W, Kaliszewski K, et al. Expression of FAS/APO-1/CD95 in thyroid tumours. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45 (2): 87-91.
33. Kim KM, Lee K, Hong YS, Park HY. Fas-mediated apoptosis and expression of related genes in human malignant hematopoietic cells. *Exp Mol Med* 2000; 32 (4): 246-254.
34. Kim YS, Kim KH, Choi JA, Lee JH, Kim HK, et al. Fas (APO-1/CD95) ligand and fas expression in renal cell carcinomas. Correlation with the prognostic factors. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 687-693.
35. Yamana K, Bilim V, Hara N, Kasahara T, Itoi T, et al. Prognostic impact of Fas/CD95/APO-1 in urothelial cancers: decreased expression of Fas is associated with disease progression. *Br J Cancer* 2005; 93: 544-551.
36. Shimoyama K, Kanda T, Liu L, Koyama Y, Suda T, et al. Expression of Fas ligand is an early event in colorectal carcinogenesis. *J of Surg Oncol* 2001; 76: 63-68.
37. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, Alexande HD, Carey BS et al. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 107 (9): 3584-3592.
38. Zupo S, Isnardi L, Megna M, Massara R, Malavasi F, et al. CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood* 1996; 88: 1365-1374.
39. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, et al. IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1840-1847.

40. Chevallier P, Penther D, Avet-Loiseau H, Robillard N, Ifrah N, et al. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 2002; 116: 142-150.
41. İbrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98 (1): 181-186.
42. Domingo-Domenech E, Domingo-Claros A, Gonzalez-Bora E, Benitez D, Alonso E, et al. CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: association with clinical presentation and outcome in 155 patients. *Haematologica* 2002; 87: 1021-1027.
43. Ottaggio L, Viaggi S, Zunino A, Zupo S, Rossi E, et al. Chromosome aberrations evaluated by comparative genomic hybridization in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with CD38 expression. *Haematologica* 2003; 88: 769-777.
44. Cruse JM, Lewis RE, Webb RN, Sanders CM, Suggs JL. Zap-70 and CD38 as predictors of IgV<sub>H</sub> mutation in CLL. *Exp Mol Pathol* 2007; 83: 459-461.
45. Vener C, Gianelli U, Cortelezzia A, Fracchiolla NS, Somalvico F, et al. ZAP-70 immunoreactivity is a prognostic marker of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2006; 47 (2): 245-251
46. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003; 101: 4944-4951.
47. Durig J, Nuckel H, Cremer M, Führer A, Halfmeyer K, et al. ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2003; 17: 2426-2434.
48. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhoph G, Simon R, Davis ER, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; 194 (11):1639-1647.

49. Morabito F, Damle RN, Deaglio S, Keating M, Ferrarini M, et al. The CD38 ectoenzyme family: advances in basic science and clinical practice. *Mol Med* 2006; 12 (11-12): 342-44.