164986

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

KRONİK LENFOSİTER LÖSEMİ OLGULARINDA ZAP-70 EKSPRESYONUNUN AKIM SİTOMETRİK ANALİZİ

Dr Selami Koçak TOPRAK
HEMATOLOJİ BD

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof Dr Muhit ÖZCAN

164986

ANKARA
2005

T.C.
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Hematoloji Bilim Dalı

Konu:
Sayı:

16.12.2005

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan, "Kronik Lenfositer Lösemi Olgularında ZAP – 70 Ekspirasyonunun Akım Sitometrik Analizi" başlıklı Uzm. Dr. selami Koçak TOPRAK'a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16.12.2005

Prof. Dr. Osman İLHAN
A.Ü.T.F Hematoloji B.D Başkanı
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Muhit ÖZCAN
A.Ü.T.F Hematoloji B.D
Tez Danışmanı

Prof. Dr. Akın UYSAL
A.Ü.T.F Hematoloji B.D
Üye

ÖNSÖZ

En sık görülen hematolojik malignite olması yönünden ayrı bir yeri olan KLL'de gittikçe önem kazanan prognostik belirleyicilerle ilişkili yapılan bu analizin ilerleyen süreçlerde planlanmış olan daha kapsamlı ve geniş hasta sayısına sahip projelere bir temel oluşturacağı açıktır.

Bu projenin doğması, geliştirilmesi ve büyütülmesinde en büyük paya sahip olmasının yanı sıra, ortaya koyduğu hipotezlerle gerekli zamanda gerekli açılımların yapılmasına önayak olan, araştırmanın her aşamasında denetim ve yol göstericiliğini yakından hissettiğim, gerek hasta izlemi ve gerekse akademik çalışma alanında tarafıma bıkıp usanmadan aktardığı yol gösterici düşünceleriyle hekimlik sanatımın olgunlaşmasına katkıda bulunan değerli hocam ve tez danışmanım Prof Dr Muhit Özcan'a; başta AÜTF Hematoloji BD Başkanı Prof Dr O İlhan olmak üzere, eğitimim süresince, yaratmış oldukları özgür ve katılımcı akademik ortam sayesinde kendilerinden gerek hematoloji ve gerekse başka alanlarda çok şey öğrendiğimi düşündüğüm, bilim dalımız öğretim üyeleri Prof Dr A Uysal, Prof Dr N Konuk, Prof Dr M Beksaç, Prof Dr H Akan, Prof Dr G Gürman, Prof Dr T Demirer, Prof Dr Ö Arslan ve Doç Dr M Arat'a; birlikte çalışmaktan büyük bir gurur ve sevinç duyduğum Uzm Dr Ender Soydan, Uzm Dr Pervin Topçuoğlu, Uzm Dr Meltem Yüksel ve Uzm Dr Şule Bakanay'a; tez çalışmamın yürütülmesinde bana yardımcı olan AÜTF İç Hastalıkları ABD'deki araştırma görevlisi arkadaşlarıma; bana büyük bir içtenlikle yardımlarını sunan bilim dalımız sekreterlerine; projenin yürütülmesi sürecinde materyal temininde yardımlarını aldığım bilim dalımız personeline; laboratuvar çalışmalarında yardımlarını zaman ve yer kavramına bağlı olmaksızın esirgemeyen Uzm Bio. Gülhis Akar'a; istatistiki analizleri kısa sürede ve titizlikle yaparak projeye büyük katkıda bulunan Biyoistatistik ABD'den Nazmiye Kurşun'a; laboratuvar sorumlusu Dr Klara Dalva'ya;

Sonsuz özveri ve sınırsız bir güvenle, yaşamımın her döneminde yanımda olduklarını bildiğim, tamamen iyi bir hekim ve akademisyen olabilmem için çırpınan aileme; teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Dr Selami Koçak TOPRAK
Aralık 2005; Ankara

İÇİNDEKİLER

Önsöz	i
İçindekiler	ii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
GEREÇ ve YÖNTEM	23
BULGULAR	27
TARTIŞMA	38
SONUÇ	42
ÖZET	45
SUMMARY	46
KAYNAKLAR	47

GİRİŞ

Kronik lenfositer lösemi (KLL), apoptozis özelliğini yitirmiş, olgun görünümdeki lenfositlerin, önceden sanılanın tersine proliferasyon sürecinde olmaksızın kan, kemik iliği (Kİ), lenf nodları ve dalağı işgal ederek birikmesi ile karakterli bir hastalıktır (1). KLL hücreleri, CD5 ve CD23 pozitifliği gösteren monoklonal B lenfositleridir. Yakın zamana ilişkin çalışmalara dayanarak bu tümör hücrelerinin memory (bellek) B lenfositlerden köken aldığı; bununla birlikte morfoloji, fenotipik prezentasyon, biyoloji, moleküler genetik özellikler ve prognoz açısından oldukça belirgin bir heterojenite gösterdiği söylenmektedir (1).

KLL en sık görülen B lenfoproliferatif hastalık olmakla birlikte fizyopatolojik ve onkojenik yolağı henüz tam olarak anlaşılamamıştır (2). Oldukça değişken özelliklere sahip bir klinik spektrumu vardır. Bazı olgularda hızla ileri evrelere geçiş izlenirken, bazılarında ise hastalık progresyonu olmadan, uzun süren bir sağ kalıma rastlanmaktadır.

Son on yılda hastalık tanı konulma yaşı küçülmüş ve eskiden olduğunun tersine hastalık ilişkili morbidite ve mortalite oranları artmıştır. Bu nedenle halihazırda varolan standart tedavi seçeneklerinin kullanım endikasyonları yeniden gözden geçirilmekte ve buna paralel olarak yeni tedavi modaliteleri araştırılmaktadır. Bilindiği üzere, hastalığa özgü tedavi rejimleri araştırılması ve elde edilmeye çalışılan daha uzun sağ kalımlar; moleküler biyoloji ile hücre düzeyindeki çalışmaların ve hematopatolojik tekniklerin geliştirilmesi ile olasıdır. Hangi hastaya ne zaman tedavi başlanacağının belirlenmesi, prognostik etkenlerin araştırılmasını önemli kılmaktadır.

Bunların ötesinde hastalığın prognostik değerlendirmeleri 30 yıl öncesine uzanan evreleme sistemlerine dayanmaktadır. Bu sistemler yıllar boyunca çeşitli araştırmacılar tarafından modifiye edilmeye çalışılmıştır. Bu yaklaşımların günümüzde de geçerli olduğu pek çok klinik çalışmada gösterilmiş olsa da, çok ciddi dezavantajları olduğu da bilinmektedir (3). Çoğu araştırmacının da kabul ettiği ve vurguladığı gibi, gerek Rai ve gerekse Binet sistemi; özellikle erken evrede prognoz belirleme ve tedavi endikasyonu koyulmasında yetersiz kalmaktadır. Bu süreçte son on yılda ve özellikle son beş yılda prognostik belirleyiciler üzerinde çalışmalar

yoğunlaştırılmıştır. Yapılan çalışmaların -genetik ve moleküler biyoloji alanında- en önemli sonuçlarından bir tanesi de ZAP-70 denilen Zeta-Associated protein 70 kD'nin saptanmasıdır. Özellikle kötü klinik seyirle ilişkili olduğu bildirilen bu protein, tirozin kinaz yapısında olup normalde T lenfosit ve NK (doğal öldürücü) hücrelerde eksprese edilmektedir. Orchard ve ark.nın Lancet'de 2004 yılında yayınlanmış, "KLL'de ZAP-70 ekspresyonu ve prognozis" adlı makalelerinin son paragrafında belirttikleri gibi; "Hala pek çok soru vardır. ZAP-70 neden sadece KLL'deki B hücrelerinde eksprese ediliyorlar da normal B lenfositlerinde eksprese edilmiyorlar? Ayrıca, neden diğer diffüz large cell lenfoma ya da folliküler lenfoma gibi B hücreli malignitelerde eksprese edilmiyorlar? Neden ZAP-70 ekspresyonu IgVH gen mutasyonu ile bu kadar sıkı ilişkili? ZAP-70 ekspresyonu KLL'de fonksiyon görüyor mu ve overekspresyonu kötü prognozla ilişkili mi? Açıktır ki, KLL'de ZAP-70 ekspresyonu ile ilişkili daha fazla çalışmaya gereksinim vardır..." (4).

Vurgulandığı üzere;

1) KLL en sık görülen hematolojik malignitedir (2).
2) Son yıllarda tanı konulma yaşı küçülmüştür (1).
3) Tedavi seçenekleri üzerinde son yıllarda en fazla tartışılan ve değişikliklere gidilen bir hastalıktır. Yakın zamana kadar oldukça konservatif yöntemlerle tedavi edilmeye çalışılırken artık allojeneik hematopoietik kök hücre transplantasyonu (AHKHT) da dahil olmak üzere pek çok tedavi modalitesi uygulanmaktadır.

Dolayısıyla hastalığın prognostik belirteçlerinin saptanmasının önemi daha iyi anlaşılmaktadır.

Biz de bu noktadan hareketle KLL tanısı koyulmuş, gerek tedaviyle ve gerekse tedavisiz izleme alınan hastalarda akım sitometrik olarak çalışılmış ZAP-70 ve CD38 ekspresyonlarını analiz etmeyi ve elde ettiğimiz değerleri hastaların klinik evre ve olasıysa klinik seyirlerindeki diğer biyolojik parametrelerle karşılaştırmayı planladık.

Proje sonunda, KLL'de ZAP-70 varlığının hastalığın klinik özellikleriyle ilişkisine ait verilerin elde edilmesi ve bunların yakın gelecekte yine tarafımızdan planlanmış olan, KLL'de ZAP-70'in, İmmünoglobulin ağır zincir değişken

bölgesinin (IgVH) mutasyonel durumunun (Ig Gen Rearranjmanı) PCR ile analiz edilmesi ve prognozla ilişkisinin araştırılması yönündeki çalışmamıza temel oluşturması öngörülmektedir.

GENEL BİLGİLER

KLL; lösemik B lenfositlerin, lenfoid dokular, Kİ ve periferik kanda klonal birikimiyle karakterize bir hastalıktır (5). Böylesine genel ve basit bir tanımlamanın altında ise sır olarak yatan bir etyopatolojik yolak -pathway- halihazırda aydınlatılmayı beklemektedir. Öyle ki, bundan on yıl önceye dayanan KLL derlemelerinde hastalığın; kusurlu bir apoptotik mekanizma nedeniyle, immatür ve immün-inkompetan B lenfositlerin birikimiyle karakterize "homojen" bir antite olduğu vurgulanırken; güncel yayınlarda ise, bundan farklı olarak birbiriyle ilişkili iki özelliğinden söz edilmektedir: Bunlardan bir tanesi, antijenik uyarılmış olgun B lenfositlerin olması ki bu lenfositler apoptozisden korunmuşturlar; diğeri de proliferasyon yeteneğine sahip ve yine apoptozisden korunmuş olan öncül hücrelerin varlığıdır (6). Dolayısıyla bu hastalık; son yıllarda değişen "tanımlanması" ve yeni yayınların ışığında saptanmış olan farklı biyolojisiyle üzerinde daha fazla çalışmayı gerektirmektedir.

Bu bölümde, KLL ve prognostik belirteçleri, ilişkili olarak ZAP-70 ve bu proteinin akım sitometrik olarak çalışılmasından söz edilecektir.

Kronik Lenfositer Lösemi

KLL, apoptozis özelliğini yitirmiş, olgun görünümdeki lenfositlerin, önceden sanılanın tersine proliferasyon sürecinde olmaksızın kan, kemik iliği (Kİ), lenf nodları ve dalağı işgal ederek birikmesi ile karakterli bir hastalıktır (1).

Epidemiyoloji:

65 yaş üzerindeki yetişkinlerde görülen tüm lösemilerin yaklaşık olarak %40'ını oluşturmaktadır (7). Batı Avrupa, Avustralya ve Kuzey Amerika'da en sık görülen hematolojik malignite olmasına karşın, Asya ülkelerinde görece az saptanmaktadır. 30 yaşın altında ise oldukça ender olan bu hastalığın insidansı yaşla

birlikte artmaktadır. Tanı sırasındaki ortanca yaş 65 ile 70 arasındadır. Yıllık insidans 3/100.000'dir. Erkek/kadın oranı ise yaklaşık olarak 2/1'dir.

Kimyasallar, diyet, sigara, radyasyon, otoimmün hastalıklar ve virusların hastalık gelişiminde direkt etkisinin olmadığı söylenegelse de son zamanlarda özellikle virutik ve bakteriyel antijenik uyarımların rolü üzerinde çok ciddi saptamalar yapılmaktadır.

Tedavi edilen ya da edilmeyen KLL olgularında ikincil malignite gelişim insidansı da artmaktadır.

Patofizyoloji:

Predispozisyon: Diğer pek çok maligniteden farklı olarak; çevresel ya da mesleki etkenlerin hastalığın insidansının artışıyla sağlam bir ilişkisi saptanamamıştır (8). Bununla birlikte, ailevi öykünün KLL ya da diğer lenfoproliferatif hastalıklarla yakın ilişkisi bilinmektedir (9). Öyle ki, her on KLL olgusundan birinin ailesinde KLL ya da diğer lenfoproliferatif hastalıklardan birisi olduğu belirtilmektedir. Buna paralel olarak, birinci derece yakında KLL olmasının hastalık gelişim riskini 30 kat arttırdığı ve ilginç olarak hasta olmayan birinci derece yakınların %13,5'inde tipik KLL immünfenotipinde periferik yayma bulgularına rastlandığı belirtilmektedir (8-11). Ailevi KLL öyküsü olanlardaki hastalık tanı konulma yaşının sporadik olgulardan yaklaşık 10 yıl küçük olduğu saptanmıştır (10).

"Ataxia telengiectasia mutation (ATM)" geninin, p53 ile ilişkili olarak DNA onarımı ve DNA hasarlanmasına apoptotik yanıtla bağlantılı olarak lenfosit gelişiminde rol oynadığı saptanmıştır (12). Ataksi telejienktazili olgularda T hücreli lenfoid malignitelere yatkınlık olduğu bildirilmiştir (12). KLL olgularının üçte birinde ATM geninin mutasyonları ya da delesyonları saptanırken, bu olgularda immünoglobulin (Ig) değişken bölgesinin mutasyonunun olmadığı da bildirilmiştir (1).

Hücresel Gelişim: Lenfositlerin çok büyük bir miktarı lenf düğümlerinde; bir kısmı da dalak, gastrointestinal kanalın submukoza tabakası ve Kİ gibi özelleşmiş lenfoid dokularda bulunur.

Gerek hücresel bağışıklıktan sorumlu olan T lenfositleri ve gerekse hümöral bağışıklıktan sorumlu olan B lenfositleri; embriyoda pluripotent

hematopoietik kök hücre ve devamında yönlendirilmiş lenfositik kök hücrelerinden farklılaşmaktadırlar. Sonuçta ortaya çıkan olgun lenfositler lenfoid dokulara yerleşmektedirler. Ancak bu aşamadan önce her iki tip lenfosit de çeşitli işlemlerden geçmek için farklı yollar izlerler. Lenfositlerden aktif T lenfositlerini oluşturacak olanlar önce timus bezine göç eder ve bu organda seçilerek işlenirler ve hücre aracılı immünitede görev almak üzere hazırlanırlar. Lenfositlerin antikor yapımını üstlenen B tipleri ise fetal yaşamın orta döneminde karaciğerde; geç fetal dönem ve doğum sonrasında ise Kİ'de işlenerek lenfoid dokuya göç ederler.

Uygun antijen ile uyarıldığında spesifik antikor oluşturabilecek çok sayıda hazır B hücresi lenfoid dokularda beklemektedir. Lenfosit, özgül antijeni tarafından uyarıldığında hızla bölünerek çoğalır. Tek bir tip antikor üretimine kaynaklık edebilen farklı lenfositlerin her biri lenfosit klonu adını almaktadır. Her klonun tüm lenfositleri birbirinin aynısı olup tek ya da özgül bir lenfositten köken almaktadırlar.

Çok sayıda gen tüm farklı antikorları kodlamaktadır. Başlangıçta, özellikle her farklı proteinin yapımı için bir genin gerektiği göz önüne alındığında milyonlarca farklı antikor molekülünün gelişimi için bir o kadar sayıda genin rol oynadığı düşünülmüştür. Ancak son yıllardaki çalışmalarda; bağışıklık sisteminin hücrelerini oluşturan ana kök hücrede tüm T ve B hücrelerinin oluşumu için gerekli genlerin tümünün olmadığı ve fakat bunun yerine çok sayıda gen segmentinin - bunlardan yüzlercesi- bulunduğu anlaşılmıştır. T ve B lenfositlerin gelişim aşamalarında bu gen segmentleri rastgele birbiriyle birleşir ve genlerin tümünü tamamlarlar. Her hücrede yüzlerce farklı gen segmenti bulunması ve bunların her hücre oluşumunda birleşme sıralamasında rastgele oluşabilecek çeşitlilik göz önüne alındığında olağanüstü çok sayıda çeşidin oluşması anlaşılabilmektedir. Sonuç olarak; oluşan her işlevsel T ve B lenfosit için, gen yapısı tek bir antijene özgü kodlamayı sağlamaktadır. Bu olgun hücreler de özgün T ya da B lenfositleri olarak lenfoid dokuya dağılan ve yerleşen hücreleri oluşturmaktadırlar.

Her lenfosit klonu yalnızca tek tip antijene yanıt verebilir. Bunun nedeni, B lenfositlerde, membran yüzeyinde, yalnızca tek tip özgül antijen ile bağlanabilecek antikor molekülünün olmasıdır. Bu yüzden, uygun antijen ortaya çıkarsa, hızla hücre membranına yapışacak ve aktivasyonu başlatacaktır. Aslında, özgül antijenle

karşılaşmadan önce B lenfosit klonları lenfoid dokuda sessizce kalırlar. Yabancı antijenin girişiyle lenfoid dokudaki makrofajlar antijeni fagosite ederler ve sonra onu komşu B lenfositlere sunarlar. Antijen B hücre yüzeyindeki uygun reseptörüne bağlandığında hücre lenfoid folliküldeki germinal merkeze ilerler (6). Burada hızlı bir bölünerek çoğalma aşamasına giren hücrede değişken gen segmentlerinin somatik hipermutasyonu görülmektedir (6). Antijenle indüklenmiş B hücre olgunlaşması T hücre aracılı olarak germinal merkezde ve T hücre aracılı olmaksızın da germinal merkez dışında lenfoid follikülün "marginal zone" denilen bölgesinde gerçekleşmektedir. Her iki yolun devamında ise olgun plazma hücresi gelişir. Plazma hücreleri de gamma globulin yapısında antikor üretimini başlatırlar. Uyarılan bir B lenfosit klonundan gelişen hücrelerin bir kısmı plazma hücresine dönüşmeyip daha az sayıda ve ana klonun benzeri yeni B lenfosite dönüşür. Bu hücreler tekrar aynı antijenle uyarılıncaya kadar sessiz kalan bellek hücreleridir.

KLL'deki monoklonal B hücre popülasyonunun, fenotipik olarak matür ve aktive -antijenik uyarı ile- edilmiş B lenfositlerinden oluştuğu ve bunların CD19, CD5 ve CD23'ü kuvvetli ekspresse ederken, yüzey IgM, IgD ve CD79b ekspresyonlarının ise zayıf olduğu bilinmektedir (6).

Hastalıkta egemen olduğu düşünülen CD5 (+) B lenfositlerin, lenfoid follikülün "mantle zone" denilen bölgesinden köken alan ve Ig ağır zincir değişken bölgesinin (IgVH) genetik mutasyonunu içermeyen hücreler olmasının yanında KLL'de neredeyse %50 olguda bu mutasyonun görülmesi ortada iki farklı antite olduğunu desteklemektedir. Bir tanesi pregerminal lenfositlerden gelişen ve IgVH mutasyonundan yoksun olan tip; diğeri ise germinal merkez geçişli lenfositlerden köken alan mutasyonal tip (1). Daha da ilginç olanı ise her iki farklı grubun da farklı genetik anomalilerle birlikte oluşudur. Örneğin daha iyi prognoza sahip olan mutasyonal tipte 13q14 delesyonları bulunurken; mutasyon göstermeyen diğer alt grup ise daha kötü klinik seyirle birlikte trizomi 12 anomalisine sahiptir (1).

Klein ve ark.nın bildirdiklerine göre; normal B lenfositler, germinal B lenfositler, CD5 (+) lenfositler, bellek hücreleri ve gerek mutasyonal gerekse unmutasyonal KLL hücreleri birbirleriyle karşılaştırıldıklarında, lösemik hücrelerin en çok bellek hücrelerine benzedikleri fark edilmiştir (13).

Bilindiği kadarıyla hastalıkta sitogenetik lezyonlar görece azdır (6). En sık görüleni ise 13q14 delesyonudur -neredeyse %50 olgudan fazlasında görülür-. 11q22-23, 17p13 ve 6q21 delesyonları ise daha az sıklıkta görülmektedir. Bu son üçü, unmutasyonal KLL olgularında karşımıza çıkan ve kötü prognozla birliktelik gösteren anomalilerdir (6).

Hastalığın hücresel gelişimiyle ilgili olarak yeni bulgular, lösemik hücrelerin proliferasyonu ve apoptozisden kurtulmalarındaki en belirgin etkenin antijenik uyarılar olduğunu desteklemektedir (6). Bundan hareketle, lenfosit yüzeyinde bulunan ve içerdiği ağır zincir değişken bölgesinin mutasyonel durumu nedeniyle iki farklı alt grubun oluşmasına neden olan B hücre reseptörleri (B-cell receptors, BCR) yani antikor yapılarının, antijenik uyarıyla etkileşim içinde olup hastalık etyopatogenezinde önemli bir ara basamağı oluşturdukları söylenebilir. İlginç olarak yüzey IgM'nin antijenle bağlanmasıyla hücre ya apoptozise gider ya da apoptozisden korunur ve fakat yüzey IgD'nin bağlanması ise hücreyi apoptozisden koruyarak aktive bir şekilde sağ kalmasına neden olur (6). Ancak araştırılması gereken ilişkili bir soru da devamlı antijenik uyarıya yol açanların neler olduğudur. Bunlar, gastrik lenfomadaki Helicobacter pylori benzeri olarak latent viruslar ya da kommensal bakteriler olabilir mi? Çevresel etkenler ve otoantijenler de klonal gelişimi tetikleyebilir mi?

Hastalıktaki klonal ekspresyonunun zemininde antijenik uyarımın devamındaki sinyal iletiminin de potent olması yatmaktadır. Hücre çekirdeğine sinyal iletim yollarında iş gören elemanların değişkenliğine göre sonuçtaki aktivasyon da farklı olmaktadır. Unmutasyonal genetik durum, ZAP-70 proteininin ve CD38'in varlığının sinyal iletiminin devamında hücrenin apoptozisden korunmasına neden olduğu bildirilmektedir (6).

Unmutasyonal IgVH genine sahip normal B lenfositler, pek çok antijenin bağlanacağı antikor oluşturma özelliğine sahiptirler. Bunların işleviyle mikroorganizmalara karşı ilk savunma hattı oluşturulmaktadır. Ancak bu hücreler herhangi bir genetik anomali içerir ya da geliştirirlerse, klonal ekspansiyona karşı dirençlerini yitirerek lösemik transformasyon için aday haline gelirler (6). Bu noktada yabancı antijenlerle birlikte otoantijenler de lösemik gelişimde etkin rol oynamaktadırlar. Burada unutulmaması gereken nokta, aynı antijenik uyarımlarla B

hücre reseptörlerinin defalarca karşı karşıya kalmalarıdır. Mutasyonal IgVH geni içeren KLL hücreleri için de aynı mekanizmadan söz edilebilir. Ancak ikisi arasındaki en önemli fark, yinelenen antijenik uyarımlarla birlikte mutasyonal olmayan tipte B hücre aktivasyonu ve devamında genetik anomalilerin de katkısıyla lösemik transformasyon görülürken; mutasyonal tipte ise bu antijenik uyarımlara yanıtın sonucunda gerek aktive olmamış ve gerekse anerjik B lenfositlerin oluşumuyla birlikte kısmen apoptozise ve kısmen de lösemik olmayan proliferasyona doğru ilerlenmesiyle birlikte malign transformasyonun görece az gerçekleştiği belirtilmektedir (6).

Tanı:

KLL'nin klasik tanı kriterleri IWCLL (International Workshop on Chronic Lymphocytic leukemia) ve NCI-Working Group (National Cancer Institute) tarafından ana hatları çizilmiş sınıflandırmaya dayanmaktadır (14-15).

IWCLL'nin 1989'da belirlediği kriterler şunlardır:

1) Periferik kanda büyük çoğunlu olgun görünümlü hücrelerden oluşan lenfosit sayısının $\geq 10 \times 10^9$/L olması,
2) Kİ aspirasyonunda %30'un üzerinde lenfoid infiltrasyon bulunması,
3) KLL ile uyumlu olacak şekilde periferik kanda B hücre fenotipinde lenfositlerin varlığı -zayıf yüzey Ig varlığı, CD5 (+) gibi-.

KLL tanısı için bu listedeki 1 numaralı kriterin yanında 2 ya da 3'ün de olması gerekmektedir. 1'in olmaması halindeyse, hem 2 ve hem de 3'ün birlikte varlığı şart koşulmaktadır.

NCI ise 1996 yılında tanı kriterlerini şu şekilde önermiştir:

1) Periferik kan lenfosit sayısının $> 5 \times 10^9$/L olması -bu hücrelerin %55'den azının atipik özellik göstermesi-. Bu hücreler a) B hücre antijenik yapılarına (CD19, CD20, CD23 ve CD5) sahip olup T hücre markeri içermeyeceklerdir; b) Monoklonalite özelliği taşıyan κ ya da λ'dan birisini içeren yüzey Ig yapısına sahip olacaklardır; c) Yüzey Ig ekspresyonu düşük yoğunluklu olacaktır.
2) Kİ aspirasyonunda %30'un üzerinde lenfoid infiltrasyon bulunması.

Güncel olarak, KLL tanısı için periferik kandaki lenfosit sayısının > 5 X 10^9/L olması ve bunların KLL immünfenotipik özellikleri gösteren küçük ve olgun görünümlü hücreler olması yeterlidir (16).

Lenfosit morfolojisine dikkat edilecek olursa karşımıza genel olarak iki alt grup çıkmaktadır: Birincisi, %90'ın üzerinde rastlanılan küçük ya da orta büyüklükte lenfositlerin oluşturduğu; diğeri ise, lenfoplazmositoid ya da prolenfositoid özellikteki hücrelerin oluşturduğu daha ender görülen gruptur.

Hastalığın tipik immünfenotipik yapılanması ise şöyledir: CD5 (+), CD23 (+), CD19 (+), FMC7 (-), CD22/CD79b ve yüzey Ig zayıf ya da (-). KLL için önerilmiş olan monoklonal antikor paneli ve skorlama sistemi aşağıda sunulmuştur.

Belirteç	Skor Puanı	
	1	0
SmIg	Zayıf	Güçlü
CD5	Pozitif	Negatif
CD23	Pozitif	Negatif
FMC7	Negatif	Pozitif
CD22 ya da CD79b	Zayıf	Güçlü

KLL için toplam skorun > 3 olması beklenirken, diğer lenfoproliferatif hastalıklarda ise bu skor < 3'tür.

Ayırıcı Tanı:

KLL tanısı genellikle periferik kan sayımları, periferik yayma bulguları ve eşlik eden immünfenotipik özellikler sayesinde kolayca konulur. Ancak ender de olsa immünhistokimyasal ve sitogenetik çalışmalar diğer tanıları ekarte etmek için kullanılabilir. Lenfositoz ile seyreden ve klinik prezentasyonu nedeniyle KLL ile ayırt edilmeyi gerektiren pek çok hastalık bulunur. Bunlar aşağıda sunulmuştur.

KLL'nin Ayırıcı Tanısı

A) Benign Nedenler

Bakteriyel (örneğin tuberkuloz)

Viral (örneğin enfeksiyöz mononükleozis)

Israrcı poliklonal B hücreli lenfositoz

Hiperaktif malaryal splenomegali

B) Malign nedenler

B Hücreli

Prolenfositik Lösemi

NHL'nin Lösemik Fazı

Mantle Cell lenfoma

Folliküler Lenfoma

Splenik Lenfoma

Marginal Zone Lenfoma

Large Cell Lenfoma

Hairy Cell Lösemi

Waldenstrom makroglobulinemisi

T Hücreli

Prolenfositik Lösemi

Adult T Cell Lösemi/lenfoma

Sezary Sendromu

Large Granular Lenfositik Lösemi

Evreleme:

Yıllardır hastalık prognozunu belirleme ve tedavi kararı verilmesinde yararlanılan iki ayrı evreleme sistemi kullanılmaktadır. Daha çok Kuzey Amerika'da kullanılan; genellikle lenfositoza eşlik eden organomegali ile anemi ve trombositopeni zeminine kurulmuş olan Rai sistemi aşağıda sunulmuştur.

Rai			Sağkalım (Yıl)
Düşük risk	0	Lenfositoz	14,5
Orta risk	I	Lenfositoz + Lenfadenopati	7,5
Orta risk	II	Lenfositoz + Splenomegali ve/veya hepatomegali	7,5
Yüksek risk	III	Lenfositoz + anemi (Hb <11 g/dl)	2,5
Yüksek risk	IV	Lenfositoz + trombositopeni (trombosit $<10^5/mm^3$)	2,5

Avrupa'da kabul görmüş ve kullanılagelen Binet evreleme sisteminde ise tutulmuş lenfadenopati sayısı ve buna eşlik eden anemi, trombositopeni düzeyleri önemlidir. Bu sistem aşağıda sunulmuştur.

Binet		Sağkalım (Yıl)
A	Anemi, trombositopeni (-) <3 bölgeden az tutulum	14
B	Anemi, trombositopeni (-) >3 bölgeden fazla tutulum	5
C	Anemi, trombositopeni (+)	2,5

PROGNOZ ve PROGNOSTİK BELİRTEÇLER

Bu çalışmanın da başlangıç noktasını oluşturduğu gibi; KLL'de kişiden kişiye farklılık gösteren, önceden kestirilmesi zor olan ve zaman zaman evreleme sistemlerine ters düşen bir klinik seyir izlenebilmektedir. Bununla birlikte gerek 1975 yılında Rai ve 1981 yılında da Binet tarafından ortaya konulmuş bu kriterler halihazırda prognozun belirlenmesinde rol oynamaktadırlar. Aşağıda KLL'deki prognostik etkenler bir tablo halinde sunulmuştur (7).

PROGNOSTİK ETKEN	KLİNİK RİSK	
MAJOR	DÜŞÜK	YÜKSEK
Cinsiyet	Kadın	Erkek
Klinik Evre	Binet A Rai 0 ve 1	Binet B ve C Rai 2, 3 ve 4
Kİ infiltrasyonu	Non-diffüz	Diffüz
Lenfosit Morfolojisi	Tipik	Atipik
Lenfosit ikilenme zamanı	> 12 ay	< 12 ay
CD38 ekspresyonu	< %20-30	> %20-30
Genetik Anormallik	Yok del 13q (tek başına)	del 11q23 Kayıp/Mutasyonal p53
Serum Timidin Kinaz düzeyi	Düşük	Yüksek
IgVH gen durumu	Mutasyonal	Unmutasyonal
ZAP-70 ekspresyonu	Düşük	Yüksek
DİĞER		
Beta 2 Mikroglobulin	Düşük	Yüksek
Soluble CD23 düzeyi	Düşük	Yüksek

Serum Markerları:

CD23, IgE için düşük afiniteli bir hücre yüzey reseptörüdür. Genellikle mantle zone B lenfositlerce eksprese edilirken germinal merkeze ait olanlarda ise görülmez. Soluble versiyonu KLL hücrelerinde fazlaca eksprese olmaktadır (17). Yayınlanan iki prospektif çalışmada yüksek serum CD23 düzeylerinin kötü prognozla ilişkisi olduğu bildirilmiştir (17).

DNA sentezi için anahtar enzim olan ve malign yükün bir göstergesi olan timidin kinaz enzimi ve diğer pek çok B lenfoproliferatif hastalıkta da eksprese olan beta 2 mikroglobulin ve yine hücre döngü hızının bir göstergesi olan laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi düzeyleri de KLL hastalarında kötü prognostik seyirle ilişkili bulunmuşlardır (16-17).

Sitogenetik:

Kromozomal translokasyonların ya da genel olarak sitogenetik anomalilerin analizi hematolojik malignitelerin nedenleri ve dahası seyirlerinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. KLL için de belirlenebilmiş çeşitli sitogenetik değişiklikler vardır. Bunlardan en yaygın olanı delesyon 13q14'dür (17). İyi prognozla ilişkili olduğu belirtilen bu anomali genellikle olguların %50'sinden fazlasında görülmektedir. İzole delesyon 13q'ya sahip olgular daha iyi prognoza sahiplerken bu delesyonun başka bir sitogenetik anomali -örneğin trizomi 12- ile birlikte olması durumunda ise görece kötü bir klinik seyir beklenmektedir (16). Bir diğer prognostik belirteç olarak sayılan trisomi 12'nin ise yaklaşık %16 olguda saptandığı bildirilmiştir (17). 17. kromozomun kısa kolunda yerleşmiş olan ve mutasyonal durumunun pek çok hematolojik malignite gelişiminde rol oynadığı bildirilen p53 tümör süpressör geni KLL'de kötü prognostik seyirle ilişkilidir. 11. kromozomda yerleşmiş olan ATM geninin anomalileri de hastalık etyopatogenezinde rol oynamaktadır. İlişkili olarak; 17p ve 11q23 delesyonlarının sırasıyla %10 ve %20 oranında saptandığı bildirilmiştir. Dahası; erken evre hastalıkta bu delesyonların bulunup bulunmadığına göre iki farklı klinik seyirden söz edilmektedir: Her iki kromozomal anomalinin olmadığı grupta görece uzun bir sağ kalım varken, delesyonların saptandığı grupta ise sağ kalımın kısa olduğu belirtilmektedir (18).

İmmünoglobulin Gen Mutasyonal Durumu:

Lenfoid folliküldeki normal germinal merkezin işlevlerinden bir tanesi de, naif B lenfositlerin ekspresse ettikleri düşük afiniteli antikorların tersine daha güçlü afinite özelliğine sahip antikor taşıyan B hücrelerini üretmektir. Buradaki sorumlu mekanizma ise; rearranje -rastgele düzenlenen- Ig genlerine ait DNA sekanslarındaki pek çok nokta mutasyonlarının gelişimine yol açan, somatik hipermutasyondur. Günümüzde, KLL'deki Ig değişken gen segmentleri bilinmektedir. Yaklaşık %50 olgu unmutasyonal değişken gen segmenti taşırken, geri kalanları da germline gen segmentlerinden farklılaşan DNA sekansları -yani mutasyonal form- içermektedirler (17). Hamblin TJ ve ark.nın bildirdiklerine göre Ig gen mutasyonu içermeyen gruptaki ortanca sağ kalım 8 yılken, mutasyona sahip grupta ise sağ kalım yaklaşık 25 yıla kadar uzamaktadır (19).

CD38 ekspresyonu:

CD38 başlangıçta T lenfosit differansiyasyon antijeni olarak tanımlanmıştır (20). 46 kDa ağırlığında tek zincirli glikoprotein yapısındaki bu molekülün "leukemic multi-lineage markers" ailesine ait olup kompleks bir aktiviteye sahip olduğu daha sonra anlaşılmıştır. Çok çeşitli işlevleri arasında; hücre içi sinyal iletimi, hücre adezyonu, endotele adezyonun önemli bir kısmı ve lenfosit "homing" sayılabilir.

CD38, normal germinal merkez B lenfositlerinin yüzeyinde eksprese edilir. CD38'in ligasyonu normal B hücre lenfopoiezisini inhibe etmektedir. Dolayısıyla anlaşılmıştır ki, CD38 sinyali aracılığıyla germinal merkez B hücrelerinin apoptozise gitmesi önlenmektedir.Bu bulgu, CD38 ekspresyon düzeyinin B hücre klonunun toplam sağ kalımını doğrudan etkilediğini göstermektedir (20).

Unutulmaması gerekir ki bu molekülün ekspresyonu ne sadece bir diziyle ve ne de sadece bir aktivasyon düzeyiyle sınırlıdır. CD34 pozitif hücrelerde, un-stimulated pregerminal merkez B lenfositlerde, az önce vurgulandığı gibi germinal merkez B lenfositlerde, myeloid öncüllerde, periferik kan NK (doğal katil) hücrelerde, aktive olmuş T ve B lenfositlerde ve de plazma hücrelerinde eksprese olduğu belirtilmektedir (20).

CD38 antijeninin tam fonksiyonu bilinmemekle birlikte, erken differansiyasyon aşamalarında apoptozisi engellenmiş lösemik hücrelerde pozitif olarak saptanırken, daha geç differansiyasyon aşamalarındaki lösemik hücrelerde ise ekspresyonu saptanamamıştır (20).

1999 yılındaki çalışmalarında Damle ve ark. CD38 ekspresyonu ile IgVH gen mutasyonu arasında güçlü bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir (21). Onların belirttiği şu iki çıkarım oldukça önemlidir:

1) Unmutasyonal gen içeren lösemik klona ait hücrelerde %30'un üzerinde CD38 ekspresyonu saptanmıştır.

2) Belirtilen bu gruba ait klinik seyir daha kötüdür.

Bu çalışmadan farklı olarak ardından yayınlanan pek çok başka çalışmada ise CD38 ve Ig mutasyonal durumunun birbirinden bağımsız antiteler olduğu vurgulanmaktadır (20).

CD38 ekspresyonu KLL olgularında kötü prognozun bir göstergesidir. Ancak ekspresyon zamanla değişiklikler gösterebilir. Hastalık progresyonu ya da eklenen bir enfeksiyon tablosu bile bu antijenin ekspresyonunu arttırabilir (20). Gerek CD38 ve gerekse diğer prognostik kriterlerin önemi, erken hastalık evresinde ileriye dönük olarak seyir üzerinde bir fikir verebilmelerinde yatmaktadır. Damle ve ark.nın bu yönde yaptıkları çalışmanın üçüncü çıkarımı ise şudur:

3) CD38 ekspresyonu %30 ve üzerinde olanlar Rai orta risk grubuna girseler bile kötü bir klinik seyre sahiptirler (21).

Açıkça vurgulamak gerekir ki pek çok başka araştırmacı da bu ilişkiyi desteklemeyen sonuçlar elde etmişlerdir (20).

ZAP-70:

Syk ailesi protein kinaz yapısı, normal B ve T lenfosit gelişimi ile bunlara ilişkin reseptör sinyal oluşumunda rol oynamaktadır. "ζ-associated protein of 70 kDa" ya da ZAP-70 de, Syk ailesine dahil, T hücre reseptör stimulasyonunun yanıt sinyal kaskadını başlatmada ve T hücre gelişiminde önemli role sahip bir tirozin kinazdır (22-23). Bu sinyal iletimi sonucunda, gerek T ve gerekse NK hücrelerde, gen ekspresyonlarına yol açan farklı transkripsiyon faktörlerinin iş görmesini sağlayıcı şekilde çeşitli enzimlerin aktivasyonu gerçekleşmektedir. ZAP-70 olgun B hücrelerde eksprese edilmemektedir. Ancak çalışmamızın da köken aldığı başlangıç noktalarından birisi olarak, bu tirozin kinazın unmutasyonal Ig ağır zincir değişken bölgesi gen konfigurasyonuna sahip KLL B lenfositlerinde saptandığı bilinmektedir (22). Carreras ve ark.nın 52 KLL olgusunda yaptıkları incelemede biri hariç tüm ZAP-70 pozitif KLL olgularının IgVH gen yapılarının unmutasyonal formda ve buna karşın yine biri hariç tüm ZAP-70 negatif olguların IgVH gen yapılarının da mutasyonal formda oldukları saptanmıştır (22).

Yaygın kabul gören önerme ise açıktır: Unmutasyonal gen yapısı taşıyan olgular normalde ZAP-70 eksprese ederler ve bunlar hızlı klinik seyir, erken süreçte tedavi gereksinmesi, kısa sağ kalım gibi kötü biyolojik özelliklerle birliktedirler. Oysa; mutasyonal tipte IgVH genetik yapısını barındıran olgularda ZAP-70 ekspresyonuna "genellikle" rastlanmaz ve bunlar diğerinin tersine yavaş klinik seyir,

uzun süre tedavisiz süreç, uzun sağ kalım gibi iyi klinikopatolojik özelliklere sahiptirler.

Hem bu önermenin mekanizması ve hem de ZAP-70'in normal B lenfositlerinde eksprese olup olmadığı konusu aydınlatılamamıştır. Yapılan pek çok çalışmanın sonucunda ZAP-70'in T ve NK hücrelerde eksprese olurken B lenfositlerde bulunmadığı kabul görmüşken, Chan ve ark. çok düşük düzeylerde de olsa dalakta ZAP-70 mRNA varlığını saptadıklarını bildirmişlerdir (24). Schweighoffer ve ark. ise düşük de olsa ZAP-70 ekspresyonunu, fareden elde ettikleri pro-B, pre-B ve olgun B lenfositlerinde gösterdiklerini yayınlamışlardır (25). Gerek Chan ve gerekse Schweighoffer, ZAP-70'in farede, pro-B'den pre-B lenfosit geçiş aşamasında iş gördüğünü ve hücre gelişimini tetiklediğini belirtmişlerdir (23).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Mayo Klinik'ten Nolz ve ark. ise dalak, tonsil ve perifer kandan taze olarak izole ettikleri B lenfositlerdeki ZAP-70 ekspresyonunu T lefositlerle karşılaştırmalı olarak western blot ve akım sitometri ile tetkik etmişlerdir (23). Sonuçta; periferik T lenfositlerle karşılaştırıldığında belirgin olarak düşük düzeylerde olmak üzere ve fakat her üç anatomik bölgeden alınan B lenfositlerde ZAP-70 ekspresyonu saptanmış olması önemlidir. Kendi aralarında karşılaştırıldığında da, tonsil ve dalaktan elde edilen B lenfositlerdeki ekspresyon periferden elde edilen B lenfositlere göre çok daha yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada Nolz ve ark., B lenfosit aktivasyonu için önemli bir marker olan CD38'in yüksek ya da düşük eksprese olmasına göre ayırdıkları iki farklı tonsil kaynaklı B lenfosit grubunda ZAP-70 ekspresyonunu da tetkik etmişlerdir. Sonuçta; yüksek CD38 ekspresyonu olan grupta yüksek ZAP-70 ekspresyonu saptanırken düşük CD38 ekspresyonuna da düşük ZAP-70 ekspresyonunun eşlik ettiği saptanmıştır.

ZAP-70'in, normal ancak farklı bölgelerden elde edilmiş B lenfositlerde farklı düzeylerde eksprese olması bu proteinin belli bir subpopülasyon ya da B lenfosit aktivasyon düzeyiyle ilişkili olabileceğini akla getirmektedir. Aynı zamanda normal B lenfositlerde B hücre reseptörünün (B cell receptor-BCR) ligasyonu ile ZAP-70 fosforilasyonu yani aktivasyonun saptandığı da bildirilmiştir (23). KLL'de artmış BCR sinyalizasyonunun artmış ZAP-70 ekspresyonuyla korelasyonu bilinmektedir (26-27). Bu fosforilasyon hücre içi sinyal iletimini başlatmaktadır. Araştırmacılar buradan yola çıkarak KLL'de kötü klinik seyirle yüksek aktivasyon

fenotipindeki popülasyon arasında paralellik kurmuşlardır (23). KLL'de sinyal aktivasyonunun ZAP-70 ekspresyonu ile ilişkisi bilinmesine karşın bunun mekanizması ve devamındaki lösemik etyopatogenezle ilişkisi tam olarak açık değildir. Oysa T lenfositlerde ZAP-70 aracılı sinyal iletimi bilinmektedir. Çeşitli araştırmacılar her iki yolağın da benzer olabileceği üzerinde durmuşlardır. Şöyle ki, T lenfositlerde, T hücre reseptörünün (TCR) uyarılması ile başlatılan ZAP-70 eskpresyonu aracılığıyla fosfolipaz C-γ1, LAT, Vav ve SLP-76 gibi çeşitli hücre içi substansların fosforilasyonu indüklenir. Bunlar da MAP kinaz ve c-Jun kinaz gibi çeşitli kinaz yolaklarına girerek T hücrelerinin maturasyon, proliferasyon ve differansiyasyonunda anahtar rol oynarlar (28). Benzer mekanizmanın BCR sinyalizasyonu ilişkili yolakta gerçekleştiği ve bunun da özellikle hücre gelişimini tetiklediği öngörülmektedir (28). Bu yaklaşım, KLL gelişiminde kimilerinin kabul ettiği -kimilerininse kabul etmediği- gibi artmış proliferasyonun kötü klinik seyirle ilişkisini açıklayabilmektedir.

Vurgulanması gerekli bir diğer nokta da, ZAP-70'in yalnızca KLL'de değil diğer B lenfoproliferatif malignitelerde de eksprese olabildiğidir. İspanya'dan Carreras ve ark.nın yaptıkları bir çalışmada, ZAP-70 ekspresyonu KLL, Burkitt's Lenfoma, Lenfoblastik Lenfoma, Mantle Cell Lenfoma, Marginal Zone Lenfoma ve Diffüz Large B Cell Lenfoma'da sırasıyla %65, %31, %29, %8, %4 ve %2 oranında pozitif bulunmuştur (22).

ZAP-70 ile unmutasyonal IgVH genetik formasyonunun birlikteliğinin kötü klinik gidişe eşlik ettiğini destekleyen pek çok çalışmanın yanında tersini destekleyen araştırma sonuçları da bulunmaktadır (28). Almanya'dan Kim ve ark.nın yaptıkları çalışmada, ZAP-70 ekspresyonunun unmutasyonal formda yüksek bulunmasına karşın mutasyon gösteren KLL olgularında da eksprese olduğu söylenmekte; Binet evreleme sistemi temelinde B ve C evresindekilerde belirgin bir kötü seyir saptanırken, ZAP-70 ekspresyonu, mutasyonal durum, CD38 ekspresyonu ya da sitogenetik anomali ile sağ kalım arasında bir ilişki bulunamadığı belirtilmektedir (28).

Yapılan pek çok araştırma göstermiştir ki, VH mutasyon analizi kompleks, pahalı, zaman alıcı ve pek çok laboratuvar için rutin uygulanamayacak kadar zordur (29). Oldukça önemli bir prognostik belirteç olmasına karşın anlatılan

bu dezavantajları nedeniyle KLL üzerine yoğunlaşmış pek çok araştırıcı son yıllarda onun yerine kullanılabilecek "vekil" bir marker bulabilme konusunda çalışmalarını sürdürmektedirler. CD38'in ekspresyonu hakkında araştırmalar halihazırda devam etse de elde edilen pek çok farklı sonuç olduğu bir gerçektir. "DNA microarrays" tekniği ile gen ekspresyonunun profillenmesi sonucu az sayıda genin mutasyonal ve unmutasyonal formda eksprese olduğu saptanmıştır. Weistner ve ark. ZAP-70 ile ilişkili olarak gerek mutasyonal ve gerekse unmutasyonal formda eksprese olan 30 kadar farklı genin karşılaştırmasını yapmışlardır (29). Ancak dönüp dolaşılıp gelinen soru ise günümüzde de aynıdır: ZAP-70, VH unmutasyonal formunda hangi mekanizmayla ve neden daha fazla eksprese olmaktadır?

Bu noktadan hareketle İngiltere'den Gibbs ve ark., ZAP-70 ekspresyonunun akım sitometrik olarak tetkiki üzerine 2005 yılında yayınladıkları çalışmalarında, rutin KLL immünfenotiplendirmesinde bu tirozin kinazı da kullanmışlardır (29).

Yakın zamana kadar ZAP-70 ekspresyonunun akım sitometrik olarak çalışıldığı dört önemli makale yayınlanmıştır: Bunlar; Crespo ve ark., 2003; Durig ve ark., 2003; Orchard ve ark., 2004; Rassenti ve ark., 2004'tür. Rassenti ve ark.nınki hariç diğerlerinde aynı antiZAP-70 antikorları kullanılmıştır. Rassenti ve ark. ise fikzasyon ve permeabilizasyon için paraformaldehit ve sabun uyguladıkları çalışmalarında, farklı bir ticari kit ile konjuge ZAP-70 antikorlarını kullanmışlardır. Diğer üç grupta da farklı teknikler uygulanmıştır: Crespo ve Durig, fikzasyon ve permeabilizasyon için ticari kit kullanırlarken, Orchard ise paraformaldehit ve etanol bazlı yöntemi tercih etmiştir (29). Bunlara en son eklenen ise ticari bir ZAP-70 antikoru ve fikzasyon-permeabilizasyon kitinin kullanıldığı Gibbs ve ark.nın bir önceki paragrafta adı geçen çalışmasıdır. ZAP-70 ekspresyonu ile VH mutasyonal durum arasındaki korelasyonu bildiren başlangıç çalışması sayılabilecek Crespo ve ark.nın makalesinin yayınlanmasından bu yana, akım sitometrik yöntemle ZAP-70 ekspresyonunun saptanması ve bunun standardizasyonuna ilişkin çabalar artmıştır.

Akım sitometrik olarak ZAP-70 ekspresyonunun tetkikindeki zorluklardan bir tanesi, normalde T lenfositlerince ZAP-70'in eksprese edilmesinin patolojik-lösemik hücre ekspresyonlarından ayırt edilmesidir. Crespo ve ark. bu zorluğu aşarken, lösemik B lenfositlerde, normal T lenfosit kadar ya da daha fazla

ZAP-70 ekspresyonu varlığını pozitif olarak kabul etmişlerdir. Orchard ve ark. ise daha farklı bir yol izlemişler; toplam ZAP-70 ekspresyonu değerinden T ve NK hücrelerince eksprese edilenleri ayırarak KLL hücrelerince eksprese edilen değere ulaşmışlardır. Gibbs ve ark. ise CD19 gibi pan-B-hücre belirtecinin pozitifliğini göz önünde tutarak T ve NK hücrelerindeki ekspresyonu dışlayabilmişlerdir (29).

ZAP-70 ekspresyonunun akım sitometrik tetkiki, diğer yöntemlere göre bazı avantajlar sunmaktadır (30). Bunlardan bir tanesi; tüm lösemik hücreler içinde ZAP-70 ekspresyonu olanların yüzdesinin kolayca saptanabilmesidir. Oysa western blot ya da RT-PCR ölçümleri T hücresindeki ZAP-70 ekspresyonundan etkilenmektedir.

KLL'nin klinik seyrindeki heterojenite, hastalığın tanısının genellikle rutin laboratuvar tetkikleri sırasında rastlantısal olarak konulması ve sahip olduğu hücre biyolojisinin farklılıklarının bir sonucudur. Ancak bilinen noktalardan birisi de diğer malignitelerde olduğu gibi KLL'de de anormal metilasyonun etyopatogenezde rol oynadığıdır (31). Acaba lösemik hücrelerdeki farklı ZAP-70 ekspresyon düzeyleri, ZAP-70 geninin metilasyon durumuyla ilişkili olabilir mi? Corcoran ve ark.nın 2005 yılında yayınladıkları çalışmalarında, ZAP-70 ekspresyonu, ZAP-70 geninin metilasyon durumu ve tabii ki IgVH gen mutasyonal konfigürasyonu arasında yakın bir ilişki saptanmıştır (31). Akım sitometrik olarak intrasitoplazmik ve zayıf bir ZAP-70 ekspresyonunun saptanmasında yaşanan zorluklara karşı bu genin metilasyon durumunun çalışılması bir ölçüde tetkik kolaylığı da sağlamıştır. KLL'de ne denli önemli bir belirteç olduğu bilinen ve fakat diğer lenfoproliferatif hastalıklarda da saptanmasına karşın o hastalıklar için bağımsız bir prognostik gösterge olarak tanımlanamayan IgVH gen mutasyonal durumuna, özellikle ZAP-70 ekspresyonu saptanan olgularda intron1-exon2 sınır bölgesinin metilasyon eksikliğinin de eşlik ettiği bildirilmiştir (31). İlginç olarak aynı çalışmada; ZAP-70 eksprese eden periferik kan T hücrelerinde ZAP-70'in aynı bölgesinin metile olmadığı ve fakat sağlıklı kontrollerdeki ZAP-70 negatif B lenfositlerde ise ayni bölgenin metilasyona uğramış olduğu saptanmıştır. Metilasyon saptanmış olgulardaki ortanca sağ kalım 211 ay iken, aynı bölgenin metilasyonu saptanmayan olgularda ise sadece 85 aydır (31). Bu sonuca paralel olarak ZAP-70 ekspresyonu

negatif olanlardaki sağ kalım 211 ay iken, pozitif olanlarda 110 ay olarak bulunmuştur.

KLL lösemik hücrelerinde ZAP-70'in neden farklı metilasyona uğradığını açıklamaya yarayacak pek çok mekanizma ileri sürülmüştür. Bunlardan birisi, B lenfosit normal olgunlaşma sürecinde görülen bir ZAP-70 normal metilasyon sürecinin yansıması olduğudur (31). Fare çalışmalarında, B lenfositteki ZAP-70'in de dahil olduğu Syk ailesinin eksikliğinin bir sonucu olarak gelişim sürecinin pro-B'den pre-B'ye geçişte bloke olduğu vurgulanmaktadır. ZAP-70'in immatur (CD19 ve CD10 pozitif) özellikteki B hücrelerinde, metilasyona uğramamış formunun T-ALL gibi B-ALL hücrelerinde de görüldüğü bilinmektedir. Belki de pek çoklarının sandığının tersine, IgVH unmutasyonal formuyla birlikte ZAP-70 ekspresyonuna sahip bu subgrubu oluşturan lösemik hücreler normalde de ZAP-70 eksprese eden immatur B lenfositlerden transformasyona uğramışlardır (31). Bir başka çıkarım ise; ZAP-70 negatif KLL olgularının, ZAP-70 metilasyonu ve IgVH mutasyonal formu gösteren olgun B hücrelerinden köken aldığıdır.

KLL etyopatogenezine yönelik çalışmalardan birisinde de onkojenik sinyalizasyonda iş gören proteinlerin katalize edilip düzenlenmesinde rol oynayan heat-shock protein 90 (Hsp90) ve bunun ZAP-70 ile ilişkisi tetkik edilmiştir (32). Hsp90 inhibitörlerinden olan 17-allylaminogeldanamycin (17-AAG) ile 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG)'nin erken evredeki KLL olgularından elde edilen hücrelerdeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen verilerden bir tanesi; ZAP-70 pozitif KLL hücrelerinin 17-AAG gibi inhibitörlerine gayet yüksek afinite gösteren aktive Hsp90 eksprese etmeleridir. Buna karşın normal lenfositler ya da ZAP-70 negatif lösemik hücrelerin aktive olmamış Hsp90 eksprese ettikleri saptanmıştır. İnvitro koşullarda Hsp90 inhibitörleriyle "tedavi" uygulandığında ise ZAP-70 degradasyonunun tetiklendiği, lösemik hücrelerde apoptozis gelişimi ve BCR sinyalizasyonunun bozulduğu fark edilmiştir. Oysa aynı çalışmada normal T lenfositlerde bu bulgulara rastlanmamıştır. İlginç bir diğer sonuç ise; ZAP-70'i kodlayan bir adenovirus ile ZAP-70 negatif lösemik lenfositler transduksiyona uğratıldıklarında, bunların aktive Hsp90 eksprese ederek inhibitörlere duyarlı hale geçmeleridir. Dolayısıyla çalışmacılar ileriki dönemlerde ZAP-70 pozitif

olan agresif seyirli olgularda Hsp90 inhibitörlerinin tedavide yer bulabileceğini belirtmektedirler (32).

IgVH gen mutasyonal durumu sabittir ve özellikle erken evredeki olgularda önemli bir prognostik belirteçtir (4). Buna karşın kromozomal anomaliler ve örneğin CD38 ekspresyonu ise tanıdan itibaren zamanla değişiklikler gösterebilir. Acaba ZAP-70 ekspresyonu zamandan bağımsız sabit midir, yoksa tedaviyle ilişkili ya da ilişkisiz değişiklikler gösterebilir mi? Orchard ve ark. çalışmalarında her ne kadar başlangıçta -tanı sırasında- ZAP-70 ekspresyonlarını ölçme olanağı bulmasalar da, iki-üç yıllık izlem süresince biri hariç 20 olgularının hiçbirisinin ZAP-70 ekspresyonlarında değişiklik olmadığını belirtmektedirler (4).

Ancak uzun izlem süreli ve yeterli sayıda olgu içeren geniş çalışmalar ZAP-70 ekspresyonunun zaman ve tedaviyle ilişkisi ve stabilitesi hakkında fikir verebilecektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalar

Temmuz 2004 ile Kasım 2005 tarihleri arasında toplam 51 olgudan ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) içeren tüplere alınan periferik kan örneklerinden yapılmış olan akım sitometrik analizler incelenmiştir.

Olguların hepsi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (AÜTF) Hematoloji Bilim Dalı'na bizzat başvuran ya da fakültemize ait diğer birimlerden konsültasyon yoluyla danışılıp tarafımızca izleme alınan hastalardır.

Değerlendirmeye alınan olguların bir kısmının tanısı daha önceki zamanda, bir kısmının ise proje yürütüldüğü süreçte konulmuştur. Olguların seçiminde, KLL tanısına sahip olmaları ve akım sitometrik olarak ZAP-70 ile CD38 ekspresyonlarının çalışılmış olması yeterli görülmüştür.

KLL tanısı için; klinik, morfolojik ve immünfenotipik özellikleriyle birlikte NCI, IWCLL kriterleri göz önünde tutularak karar verilmiştir.

Akım Sitometrik Tetkik

Her olguya ait periferik kan örneğindeki ZAP-70 ekspresyonu tayini için, gerek hücre fiksasyon-permeabilizasyonu ve gerekse antikor uygulanması ilk 24 saat içinde gerçekleştirilmiştir.

Çalışma sırasında tüp başına $1x10^6$ µL / hücre olacak şekilde ayarlanmış tam kan örnekleri kullanılmıştır. Örneklerde immunfenotiplendirme, yüzeyel ve intrasitoplazmik olarak yapılmıştır. Yüzeyel immunfenotiplendirme için, fluorescein isothiocyanate (FITC) ile konjuge edilmiş CD45, CD5, CD23, FMC7, CD103, immünoglobulin hafif zincir *Kappa* (Beckman Coulter, Marseille, France), phycoerythrin (PE) ile konjuge edilmiş CD14, CD19, CD38, CD52, CD11c, immünoglobulin hafif zincir *Lambda* (Beckman Coulter, Marseille, France), PC5 ile konjuge edilmiş HLA DR, CD2, CD20, CD10, CD25 (Beckman Coulter, Marseille, France) kullanılmıştır. İntrasitoplazmik çalışmada PE ile konjuge anti-ZAP-70 (Caltag, USA) antikoru kullanılmıştır.

Yeni tanı olarak gelen bütün hasta örneklerine önce lenfoproliferatif 1. adım paneli (CD45 / CD14 / HLA DR, CD5 / CD19 / CD2) çalışılmış; yapılan analiz sonucu CD5+ ve CD19+ çıkan örneklerde B lenfoproliferatif panel uygulanarak alt tiplendirme yapılmıştır. Daha önce KLL olduğu bilinen hastalar ise doğrudan CD23, CD38, CD2, ZAP-70, CD19 ve CD5 çalışılarak değerlendirmeye alınmışlardır.

CD38 ve Diğer Membran Elemanlarının Boyanması

Yüzeyel boyama için -örneğin CD38 ekspresyonu- tüp başına 100 µL kan örneği ile 10 µL antikorlar 20 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edilmişlerdir. Ardından, %1,5 oranında formaldehit içeren OptiLyse C (Beckman Coulter, Marseille, France) "lysing" solüsyonu eklenerek ortamdaki "debris" ve eritrositler de uzaklaştırılmıştır. Homojenize edilerek 10 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildikten sonra, hücre süspansiyonu 250 X g'de santrifüj edilmişlerdir. Sürnatant sıvı dökülerek hücre pelleti üzerine ISOTON II (izotonik) (Beckman Coulter, Marseille, France) eklenerek tekrar santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki defa tekrarlanarak hücrelerin bağlanmamış antikorlardan ve "debris"lerden kurtulması sağlanmaktadır. Tüm bu işlemler sonunda tüplere %1 paraformaldehit içeren PBS (Biochrom, Berlin, Germany) solüsyonu eklenerek +4°C'de analiz yapılana kadar bozulmadan beklemesi sağlanmaktadır.

CD38-PE, CD23 FITC pozitif lenfositlerde ölçülmüştür.

ZAP-70'in (intrasitoplazmik eleman) Boyanması

ZAP-70 için ise intrasitoplazmik bir çalışma yürütülmüştür. Yüzeyel antikorları eklenen tüpe 100 µL tam kan örneği koyulduktan sonra homojenize edilerek 20 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edilmiş ve hücreleri permeabilize etmek için "IntraPrep Permeabilization" (Immunotech, Beckman Coulter, Marseille, France) kiti eklenmiştir. Tüpe 100 µL Reagent 1 eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta yüzeyel antikorların fiksasyonu sağlandıktan sonra, 2 mL ISOTON II (izotonik) (Beckman Coulter) eklenerek 250 X g'de santrifüj edilmişlerdir. Sürnatant sıvı, dibindeki hücre pelleti oynatılmadan atıldıktan sonra hücrelerin permeabilizasyonunu sağlamak için 100 µL Reagent 2 eklenerek 5 dakika bekletilmişlerdir. 5 µL ZAP-70 (Caltag, USA) antikoru eklenen tüpler homojenize

edildikten sonra +4°C'de 2 saat inkübe edilmişlerdir. Süre sonunda yüzeyel boyamalar için yapılan yıkama işlemleri yinelenerek %1 paraformaldehit içeren PBS (Biochrom, Berlin, Germany) solüsyonu eklenerek +4°C'de analiz yapılana kadar bozulmadan beklemesi sağlanmıştır.

PANEL

Tüp no	Miktar	FITC	PE	ECD	PC5
1	10 µL	CD 45	CD 14	-	-
2	10 µL	Mouse IgG1	Mouse IgG1	-	Mouse IgG1
3	10 µL	CD 19	CD 5	-	-
4	10 µL	CD 23	CD38	-	-
5	10 µL	CD 2	cZAP-70	-	CD19

Çalışmada her tüp için 10.000 hücre sayılmış; analizlerde ise RXP yazılımı ve FC500 Cytomics (Beckman Coulter, Marseille, France) cihazı kullanılmıştır.

ZAP-70

Sitoplazmada yerleşmiş bu tirozin kinazın akım sitometrik olarak çalışılabilmesi için vurgulandığı gibi hücre membranının permeabilizasyonu gerekmektedir. Bu permeabilizasyon işlemi, laboratuarımızda IntraPrep Permeabilization (Immunotech, France) kiti ile genel hücre morfolojisinin bozulmaması gözetilerek gerçekleştirilmektedir. ZAP-70'in işaretlenmesi aşamasında ise, Crespo ve ark. (30), Chen ve ark. (26) kullanmış olduğu materyalin aynısı uygulanmıştır: Rutin uygulamada 5 µL anti-ZAP-70 PE (Caltag, USA) antikoru kullanılmaktadır.

İstatistik

ZAP-70 ve CD38 ekspresyonları ile klinik ve biyolojik parametrelerin arasındaki ilişkiler "chi-square" ve bağlantılı olarak "Fisher's Exact Test" ile değerlendirilmiştir. Bu iki parametre arasında uyumun olup olmadığına kappa testi ile bakılmıştır. Verilerin analizinde ise SPSS (SPSS Inc, Chicago, USA) yazılımı kullanılmıştır.

Tüm değerlendirmeler, AÜTF Biyoistatistik ABD'de yapılmıştır.

BULGULAR

Bu çalışmaya temmuz 2004 ile kasım 2005 tarihleri arasında tarafımıza başvuran 51 adet KLL olgusu dahil edilmiştir. Olguların çalışmaya katılmasında tek ölçüt olarak KLL tanısına sahip olmaları dikkate alınmış; tanı zamanları, daha önce tedavi alıp almadıkları, vb parametreler göz ardı edilmiştir. Hastaların izlem sürelerinde birden fazla sayıda akım sitometrik incelemeleri yapılmış, bunlardan bazılarında da birden fazla sayıda ZAP-70 ve CD38 ekspresyonu birlikte tetkik edilmiştir. Ancak objektiviteyi bozmamak adına olguların varsa tanı sırasındaki -ZAP-70 ve CD38 analizini içeren- akım sitometrik tetkiki ya da izlem sürecinde herhangi bir zamandaki -olasıysa en yakın; ZAP-70 ve CD38 analizini içeren- akım sitometrik tetkiki değerlendirmeye alınmıştır.

51 olgunun 30'u erkek (%58,8) ve 21'i de (%41,2) kadın olup, yaş ortalaması 59,72 ± 12,15'tir. Tanı zamanındaki bilgilerine ulaşılan toplam 32 olgudan 22'si erken, 10'u ise ileri evrede çıkmıştır; sırasıyla %68,8 ve %31,3 (6). Akım sitometrik analiz örneklemesi yapıldığı tarihte bilgilerine ulaşılan toplam 35 olgudan 21'i erken ve 14'ü ise ileri evrede çıkmıştır; sırasıyla % 60 ve %40.

15 olguda ZAP-70 pozitif (ekspresyon ≥%20) olarak saptanırken, 36 olguda ise negatif bulunmuştur; sırasıyla %29,4 ve %70,6. Buna karşın, CD38 ekspresyonu ise 34 olguda pozitif (ekspresyon ≥%20) ve 17 olguda negatif saptanmıştır; sırasıyla %66,7 ve %33,3.

ZAP-70 ve CD38 ekspresyonlarının yanında ilişkili olabileceğini düşündüğümüz bir takım klinik ve laboratuvar özellikleri de değerlendirmeye alınmıştır. Bunlardan bir tanesi de hastaların doktora başvuru sırasında yakınmalarının olup olmamasıdır. Bilgilerine ulaşılan toplam 35 olgunun -akım sitometrik olarak ZAP-70 ve CD38 analizinin yapıldığı süreçte- 20'sinde herhangi bir yakınma olmazken, 15'inde ise hastayı doktora getiren nedenin hastalıkla ilişkili bir yakınma olduğu saptanmıştır; sırasıyla %57,1 ve %42,9. Prognostik belirteçlerden bir tanesi olarak LDH düzeyleri de akım sitometrik analiz yapıldığı süreçte tetkik edilmiştir. Buna göre; 38 olguda normal sınırlarda ve 13 olguda ise yüksek bulunmuştur; sırasıyla %74,5 ve %25,5. Bir diğer laboratuvar parametre olan ve hücre döngü, metabolizma hızının göstergesi olarak sayılan ürik asid (UA)

düzeylerine bakılacak olursa, aynı şekilde akım sitometrik analiz sırasında, 45 olguda normal olarak saptanırken yalnızca 6 olguda yüksek bulunmuştur; sırasıyla %88,2 ve %11,8. Rai ve Binet evreleme sistemlerinde de kullanılan ve ileri evrenin bir göstergesi sayılan anemi de aynı koşullarda analiz edilmiştir: 42 olguya karşılık sadece 9 olguda anemi saptanmıştır; sırasıyla %82,4 ve %17,6.

Hastaların tedavi durumları da incelenen parametreler arasındadır. Hastalarda; tanı sırasında, akım sitometrik analiz yapıldığı sırada, diğer herhangi bir süreçte ve halihazırda güncel olarak tedavi uygulanıp uygulanmadığı analiz edilmiştir. Buna göre, tanı sırasındaki bilgilerine ulaşılmış 35 olgunun 24'ünde tedavi gereksinmesi yokken 11'inde tedavi verilmiştir, sırasıyla %68,6 ve %31,4. Akım sitometrik olarak ZAP-70 ve CD38 analizinin yapıldığı süreçte ise; toplam 35 olgunun 22'sinde tedavi verilmemişken 13'ünde ise verilmiştir, sırasıyla %62,9 ve %37,1. Hastaların herhangi bir süreçte tedavi alıp almadıkları da değerlendirilmiş ve sonunda 35 olgunun -bilgilerine ulaşılmış- 25'i tedavi almazken 10'unun ise herhangi bir sırada tedavi aldığı saptanmıştır, sırasıyla %71,4 ve %28,6. Son olarak hastaların bu analiz yapıldığı sıradaki tedavi gereksinmeleri de tetkik edilmiştir: Bilgilerine ulaşılan 35 olguda, benzer şekilde 25'e karşılık 10 olgunun tedavi almakta olduğu görülmüştür, sırasıyla %71,4 ve %28,6.

Hastaların gerek laboratuvar ve gerekse klinik parametreleri birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Bu süreçte, öncelikle tanı sırasında evre bilgisine ulaşılmış olguların izlem dönemlerinin herhangi bir aşamasında çalışılmış olan ZAP-70 ve CD38 ekspresyonları ve aynı periyoddaki diğer laboratuvar-klinik parametrelerle ilişkileri ve ardından da akım sitometrik olarak ZAP-70 ve CD38 ekspresyonunun tetkik edildiği sıradaki evre ile diğer laboratuvar-klinik parametrelerin ilişkileri araştırılmıştır. Sonrasında da çalışmamızın hareket kaynağını oluşturan, akım sitometrik olarak çalışılan ZAP-70 ve CD38 ekspresyonunun aynı dönemdeki diğer özelliklerle ilişkilerinin olup olmadığı analiz edilmiştir.

Tanı Sırasında Evre ve Diğer Bilgilerine Ulaşılan Olgular

1975 yılında Rai ve ark. ilk kez KLL evrelemesi ile ilgili ortaya koydukları sistemi yayınladıklarında ortanca sağkalım rakamlarını da sunmuşlardır. Orijinal olarak beş alt gruba ayırdıkları bu sistemi daha sonra 1987 yılında Rai

yayınladığı bir diğer makalesinde modifiye ederek risk derecelendirmesine göre düşük, orta ve yüksek olarak üç gruba bölmüştür (33). Bununla birlikte ilk sunulan makaleye bakıldığında, Herishanu ve ark.nın önerdikleri gibi, sağ kalım süreleri göz önüne alındığında, hastaları düşük riskli olarak evre 0 ve 1; yüksek riskli olarak da evre 2, 3 ve 4'e dahil olanlar şeklinde iki gruba ayırabiliriz (7). Dolayısıyla araştırmamızda tanı sırasındaki evre ve ilişkili bilgilerine ulaşılan toplam 32 olgunun 22'si düşük-erken, 10'u ise yüksek-ileri evreye girmektedir. Erken evredeki 22 hastanın 15'inde ZAP-70 negatif bulunmuşken, yalnızca 7'sinde pozitif saptanmıştır, sırasıyla %68,2 ve %31,8. Bununla birlikte, ileri evrede bulunan 10 hastanın da 8'inde ZAP-70 negatifken, yalnızca 2'sinde pozitif saptanmıştır, sırasıyla %80,0 ve %20,0. Olgu sayısına uygun istatistiki değerlendirmede ise ZAP-70 ekspresyon varlığının erken ve ileri evre arasında farklı olmadığı görülmüştür (p=0,681). Benzer analiz CD38 ekspresyonu için de yapılmıştır. Erken evrede olan 22 olgunun 5'inde negatif ve 17'sinde pozitif bulunmasına karşın, sırasıyla %22,7 ve %77,3; ileri evredeki olguların 6'sında negatif ve ancak 4'ünde pozitif saptanmıştır, sırasıyla %60,0 ve %40,0. Evre ve CD38 arasında da istatistiki bir anlam saptanamamıştır (p=0,056).

Evre durumuyla, hastaların başvuru sırasında yakınmalarının olup olmadığı da karşılaştırılmıştır. Buna göre; erken evrede olan 22 olgunun 14'ünün yakınmasının olmadığı ve fakat 8'inin yakınmasının olduğu saptanmıştır, sırasıyla %63,6 ve %36,4. İleri evreye bakıldığında ise 10 olgunun 5'inin yakınmasının olduğu ve 5'inin de olmadığı görülmüştür, sırasıyla %50 ve %50. Tanı sırasında evresi bilinen 32 olgunun yakınmalarının olup olmamasıyla yapılan karşılaştırmada istatistiki bir fark bulunamamıştır (p=0,699).

Prognostik göstergelerden bir tanesi olan LDH düzeylerinin normalin üstünde olup olmadığıyla hastaların evre durumları da birlikte analiz edilmişlerdir. Erken evredeki 22 olgunun 17'sinde LDH düzeyleri normal sınırlarda saptanırken, 5'inde ise yüksek bulunmuştur, sırasıyla %77,3 ve %22,7. Buna karşın ileri evredeki 10 olgunun 7'sinde normal ve sadece 3'ünde yüksek LDH düzeyleri tespit edilmiştir, sırasıyla %70,0 ve %30,0. İstatistiki olarak evre durumuyla LDH düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (p=0,681).

Benzer değerlendirme bir diğer prognoz belirteci UA ile yapılmıştır. Erken evredeki 22 olgunun 21'de UA düzeyleri normal sınırlarda olup sadece 1'inde yüksek bulunmuştur, sırasıyla %95,5 ve %4,5. Bununla birlikte ilerievredeki 10 olgunun 8'inde normal ve sadece 2'sinde yüksek UA değerleri saptanmıştır, sırasıyla %90,6 ve %9,4. Evre ve UA düzeyleri arasında da istatistiki bir anlam bulunamamıştır (p=0,224).

Çalışmamızda Hb değerinin ≤ 10 gr/dl olması durumunda anemi varlığı pozitif olarak değerlendirilmiştir. Buna göre erken evredeki 22 olgunun 21'inde anemi yokken sadece 1'inde anemi saptanmıştır, sırasıyla %95,5 ve %4,5. Buna karşın ileri evredeki 10 olgunun yarısında anemi saptanmazken yarısında ise anemi varlığına rastlanmıştır, sırasıyla %50,0 ve %50,0. Bu iki grup arasında istatistiki olarak fark saptanmıştır (p=0,06).

Tanı sırasında tedavi alıp almama durumu da evre ile karşılaştırılmıştır. Tanı sırasında erken evrede olduğu tespit edilmiş 22 olgunun 19'unda tedavi gereksinmesi yokken 3'ünün tedavi almış olduğu saptanmıştır, sırasıyla %86,4 ve %13,6. Bununla birlikte ileri evredeki 10 olgunun 3'üne tedavi verilmezken 7'sine ise tanı sürecinde tedavi başlandığı saptanmıştır, sırasıyla %30,0 ve %70,0. Evre durumuyla tanı sırasındaki tedavi gereksinmesi arasında da istatistiki olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır (p=0,003).

Evre ile hastanın herhangi bir süreçteki tedavi gereksinmesi karşılaştırıldığında ise; 22 adet erken evre olgusunun 16'sında tedavi yokken, 6'sında tedavi verildiği bulunmuştur, sırasıyla %72,7 ve %27,3. Bununla birlikte 10 adet ileri evre olgusunun 7'sinde tedavi verilmezken, 3'ünün tedavi almış olduğu belirlenmiştir, sırasıyla %70,0 ve %30,0. Bu iki parametre arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=1,000).

Sonuncu analiz ise, hastaların tanı sırasındaki evrelerine karşılık bu değerlendirmenin yapıldığı halihazırda yani güncel olarak tedavi alıp almadıklarının karşılaştırılması olmuştur. 22 erken evredeki olgunun 17'si güncel olarak tedavi almazken 5'i halihazırda tedavi almaktadır, sırasıyla %77,3 ve %22,5. İleri evrede bulunan 10 olgunun 6'sında tedavi yokken, 5'ine ise güncel olarak tedavi verilmektedir, sırasıyla %60,0 ve %40,0. Bunların arasındaki ilişki ise istatistiki olarak anlamlı bulunamamıştır (p=0,407).

Tablo: "Tanı Sırasında Evre ve Diğer Bilgilerine Ulaşılan Olgular"ın Sonuçları

PARAMETRE	EVRE		İSTATİSTİK
ZAP-70	0 - 1	2 - 3 - 4	p=0,681
CD38	0 - 1	2 - 3 - 4	p=0,056
Yakınma	0 - 1	2 - 3 - 4	p=0,699
LDH - UA	0 - 1	2 - 3 - 4	p=0,681 p=0,224
Anemi	**0 - 1**	**2 - 3 - 4**	**p=0,06**
Tanı Sürecinde Tedavi	**0 - 1**	**2 - 3 - 4**	**p=0,003**
Diğer - Güncel Tedavi	0 - 1	2 - 3 - 4	p=1,000 p=0,407

Akım Sitometrik Çalışmanın Yapıldığı Süreçteki Evre ve Diğer Parametrelerin Analizi

Hastaların değerlendirilmesinde temel olarak alınan gerek ZAP-70 ve gerekse CD38 ekspresyonlarının analiz edildiği akım sitometrisinin çalışıldığı dönemdir. Vurgulandığı üzere, hastaların izlem süreçlerinde KLL tanısına yönelik birden fazla sayıda akım sitometrik çalışma ya da ZAP-70 ve CD38 analizlerini içeren prognostik belirlemeye yönelik birden fazla sayıda akım sitometrik çalışma gerçekleştirilmiştir. Homojenizasyon ve objektivite gözetilerek, çalışmanın amacında olmayan "izlem" parametresi de göz ardı edilerek, hastalık süreçlerinin bir bölümünde ZAP-70 ve CD38 ekspresyonları tayin edilmiş olguların bu döneme ait evre ve klinik-laboratuvar özellikleri birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

Belirtilen bu döneme ait bilgilerine ulaşılan toplam olarak 35 olgu saptanmıştır. Bunlardan erken evrede olan 21 olgunun 14'ünde ZAP-70 ekspresyonu negatif olarak saptanırken, 7'sinde ise pozitif bulunmuştur, sırasıyla %66,7 ve %33,3. İleri evrede olan 14 olgunun 10'unda ZAP-70 ekspresyonu negatifken, sadece 4'ünde pozitiftir, sırasıyla %71,4 ve %28,6. Akım sitometrik inceleme yapılan döneme ilişkin ZAP-70 ekspresyonu ile evre durumu arasında istatistiki anlamlı bir fark saptanamamıştır (p=1,000). Benzer olarak aynı süreçteki CD38 ekspresyonları da analiz edilmişlerdir. Buna göre; erken evrede olan 21 olgunun 7'sinde negatif ekspresyon saptanırken, 14'ünde ise pozitif bulunmuştur, sırasıyla %33,3 ve %66,7. İleri evreye ilişkin 14 olgudan 6'sında negatif ve 8'inde ise pozitif

CD38 ekspresyonu bulunmuştur, sırasıyla %42,9 ve %57,1. Bu iki grup arasında da CD38 ekspresyonu yönünden bir fark görülmemiştir (p=0,568).

Hastaların akım sitometrik analiz yapıldığı dönemdeki başvuru sırasında yakınmaların olup olmaması da gözetilmiş ve bunlar da ZAP-70 ve CD38 ekspresyonları ile karşılaştırılmıştır. Erken evredeki 21 olgunun 15'inde yakınma yokken, 6'sının ise herhangi bir hastalık ilişkili yakınma ile doktora başvurduğu saptanmıştır, sırasıyla %71,4 ve %28,6. Buna karşın ileri evredeki 14 olgunun 5'inde herhangi bir yakınmaya rastlanmazken 9'unda ise saptanmıştır, sırasıyla %35,7 ve %64,3. Evre durumu ile yakınma olup olmaması arasında ise istatistiki bir fark saptanmıştır (p=0,036).

LDH düzeylerinin erken evredeki 18 olguda normal, 3 olguda yüksekken, sırasıyla %85,7 ve %14,3; ileri evredeki 8 olguda normal ve 6 olguda ise yüksek olduğu saptanmıştır, sırasıyla %57,1 ve %42,9. Evre durumu ve LDH düzeyleri arasında herhangi bir istatistiki fark bulunamamıştır (p=0,112).

UA düzeylerine bakıldığında ise; erken evrede bulunan 20 olguda normal ve 1 olguda yüksekken, sırasıyla %95,2 ve %4,8; ileri evredeki 10 olguda normal ve sadece 4 olguda normalin üstünde olduğu görülmüştür, sırasıyla %71,4 ve %28,6. Evre durumu ve UA düzeyleri arasında istatistiki olarak herhangi bir fark saptanmamıştır (p=0,134).

ZAP-70 ve CD38 ekspresyonları ile anemi varlığı da karşılaştırılmıştır. Buna göre; 19 erken evre olguda anemi saptanmazken, sadece 2 olguda anemi varlığına rastlanmıştır, sırasıyla %90,5 ve %9,5. İleri evrede olup da anemi saptanmayan 10 olguya karşılık 4 olguda ise anemi bulunmuştur, sırasıyla %71,4 ve %28,6. ZAP-70 ve CD38 ekspresyonunun çalışıldığı periyodda, ileri ya da erken evrede olmakla anemi varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (p=0,191).

Analizi yapılan bir diğer parametre ise her iki markerın ekspresyonlarının çalışıldığı dönemdeki evre durumu ile tedavi gereksinmesi arasında bir ilişki olup olmadığıdır. Bu döneme ilişkin erken evrede bulunan 16 olguya tedavi verilmezken, 5 olguya ise uygulanmış olduğu görülmüştür, sırasıyla %76,2 ve %23,8. İleri evredeki 6 olgu tedavi almazken, 8 olgu ise tedavi görmüştür, sırasıyla %42,9 ve %57,1. Evre durumu ile tedavi gereksinmesi arasında ise anlamlı bir fark saptanmıştır (p=0,046).

Hastaların izlem süreçlerinde herhangi bir zamanda tedavi alıp almadıkları ile akım sitometrik analiz yapıldığı döneme ilişkin evre durumları karşılaştırıldığında; erken evredeki 15 olgunun tedavi almadığı ve fakat 6 olgunun aldığı görülmüştür, sırasıyla %71,4 ve %28,6. İleri evredeki 10 olgunun da benzer şekilde tedavi almadığı ve buna karşın sadece 4 olgunun tedavi almış olduğu saptanmıştır, sırasıyla %71,4 ve %28,6. Bu iki parametre arasında da anlamlı bir fark görülmemiştir (p=1,000).

Son olarak, evre durumlarıyla bu analizin yapıldığı dönemdeki güncel tedavi gereksinmeleri karşılaştırılmıştır. Buna göre; erken evredeki 17 olgu halihazırda tedavi almazken sadece 4 olguya tedavi verilmekte olduğu görülmüştür, sırasıyla %81,0 ve %19,0. Güncel olarak, ileri evredeki 8 olgu tedavisiz izlenmekteyken, 6 olgu ise tedavi almaktadır, sırasıyla %57,1 ve %42,9. Bu iki durum arasında da istatistiki bir fark bulunamamıştır (p=0,151).

Tablo: Akım Sitometrik Çalışmanın Yapıldığı Süreçteki Evre ve Diğer Parametrelerin Analizi

PARAMETRE	EVRE		İSTATİSTİK
ZAP-70	0 - 1	2 - 3 - 4	p=1,000
CD38	0 - 1	2 - 3 - 4	p=0,568
Yakınma	**0 - 1**	**2 - 3 - 4**	**p=0,036**
LDH - UA	0 - 1	2 - 3 - 4	p=0,112 p=0,134
Anemi	0 - 1	2 - 3 - 4	p=0,191
Tedavi	**0 - 1**	**2 - 3 - 4**	**p=0,046**
Diğer - Güncel Tedavi	0 - 1	2 - 3 - 4	p=1,000 p=0,151

ZAP-70 Ekspresyonu İle Diğer Klinik ve Laboratuvar Parametrelerinin Karşılaştırılması

ZAP-70 ekspresyonu negatif olan 36 olgunun erkek ve 13 olgunun da kadın olduğu, sırasıyla %63,9 ve %36,1; buna karşın ZAP-70 ekspresyonunun pozitif saptandığı 15 olgudan 7'sinin erkek ve 8'inin de kadın olduğu bulunmuştur, sırasıyla %46,7 ve %53,3. Dolayısıyla ZAP-70 ekspresyonu ile cinsiyet arasında istatistiki bir ilişki saptanamamıştır (p=0,255).

ZAP-70 ekspresyonu çalışıldığı sırada bilgilerine ulaşılmış olan 35 olgunun yakınmalarının olup olmadığı da analiz edilmiştir. Buna göre ZAP-70 ekspresyonu negatif olan 24 olgunun 17'sinde herhangi bir yakınmaya rastlanmazken, sadece 7'sinde hastalık ilişkili bir yakınma tespit edilmiştir, sırasıyla %70,8 ve %29,2. Buna karşın, ZAP-70 ekspresyonu pozitif saptanan 11 olgunun 3'ünde herhangi bir yakınma bulunmazken, 8'inde ise hastayı doktora getiren bir yakınmaya rastlanmıştır, sırasıyla %27,3 ve %72,7. Hastaların ZAP-70 ekspresyonları ile yakınmalarının olup olmaması arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (p=0,027).

ZAP-70 ekspresyonu negatif olan 28 olgunun LDH düzeyleri de düşük saptanırken, 8 olguda ise LDH normalin üstünde saptanmıştır, sırasıyla %77,8 ve %22,2. Buna karşın ZAP-70 ekspresyonu pozitif olan 10 olguda LDH normal ve 5 olguda ise normalin üstünde saptanmıştır, sırasıyla %66,7 ve %33,3. ZAP-70 ekspresyonu ile LDH düzeyleri arasında da anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (p=0,487).

Aynı değerlendirme UA düzeyleri ile yapıldığında; ZAP-70 negatif 34 olguda UA düzeyleri de normal sınırlarda ve 2 olguda da normalin üstünde bulunmuştur, sırasıyla %94,4 ve %5,6. Buna paralel olarak ZAP-70 pozitif olgulardan 11'inde UA normalken, 4'ünde ise yüksek çıkmıştır, sırasıyla %73,3 ve %26,7. ZAP-70'in ekspresyonu ile UA düzeyleri arasında da bir ilişki bulunamamıştır (p=0,054).

Gerek Binet ve gerekse Rai evrelendirme sisteminde ileri evre göstergesi olarak kullanılan anemi ile ZAP-70 ekspresyonu karşılaştırılmıştır. ZAP-70 ekspresyonu negatif olan 31 olguda anemi saptanmazken, 5 olguda bulunmuştur, sırasıyla %86,1 ve %13,9. Bununla birlikte ZAP-70 ekspresyonu pozitif olan 11 olguda anemi saptanmazken ancak 4 olguda bulunmuştur, sırasıyla %73,3 ve %26,7. Bu iki parametre arasında da bir ilişki yoktur (p=0,421).

ZAP-70 ekspresyonunun çalışıldığı süreçte hastaların tedavi alıp almadıkları da değerlendirilmiştir. Buna göre; ZAP-70 ekspresyonu negatif olan 18 olgu tedavi almazken sadece 6 olgu tedavi almıştır, sırasıyla %75,0 ve %25,0. Buna karşın, ZAP-70 pozitif olan 4 olgunun tedavi görmemesine karşılık 7 olgu tedavi

almıştır, sırasıyla %36,4 ve %63,6. Ancak bu iki parametre arasında da istatistiki olarak bir fark bulunamamıştır (p=0,057).

Son olarak ZAP-70 ekspresyonu hastaların izlem sürelerinin sonunda, bu analizin yapıldığı süreçteki tedavi gereksinmeleri ile karşılaştırılmıştır. Buna göre; 24 adet ZAP-70 negatif olgudan 21'ine halihazırda tedavi verilmezken, 3 olgunun ise tedavi almakta olduğu saptanmıştır, sırasıyla %87,5 ve %12,5. ZAP-70 ekspresyonu pozitif olarak bulunan 11 olgunun 4'ünün tedavi almadığı saptanmışken 7'sinin ise güncel olarak tedavi altında olduğu görülmüştür, sırasıyla %36,4 ve %63,6. Hastaların güncel tedavi durumları ile ZAP-70 ekspresyonlarının varlığı arasında istatistiki bir ilişki göze çarpmaktadır (p=0,004).

Tablo: ZAP-70 Ekspresyonu İle Diğer Parametrelerinin Karşılaştırılması

PARAMETRE	**ZAP-70**		**İSTATİSTİK**
Cinsiyet	NEGATİF	POZİTİF	p=0,255
Yakınma	**NEGATİF**	**POZİTİF**	**p=0,027**
LDH - UA	NEGATİF	POZİTİF	p=0,487 p=0,054
Anemi	NEGATİF	POZİTİF	p=0,421
Tedavi	NEGATİF	POZİTİF	p=0,057
Güncel Tedavi	**NEGATİF**	**POZİTİF**	**p=0,004**

CD38 Ekspresyonu İle Diğer Klinik ve Laboratuvar Parametrelerinin Karşılaştırılması

Hücre membranında bulunan CD38 de ekspresyonu çalışılmış olan bir diğer prognostik belirteçtir. Cinsiyet ile ilişkili olup olmadığına yönelik yapılan analizde; CD38 ekspresyonu negatif saptanan 17 olgunun 10'u erkek ve 7'si kadın olarak saptanırken, sırasıyla %58,8 ve %41,2; CD38 ekspresyonu pozitif olan 34 olgunun 20'sinin erkek ve 14'ünün de kadın olduğu görülmüştür, sırasıyla %58,8 ve %41,2. Cinsiyet ile CD38 ekspresyonu arasında istatistiki bir ilişki bulunamamıştır (p=1,000).

Hastaları doktora getiren herhangi bir yakınma olup olmamasıyla CD38 ekspresyonu birlikte analiz edilmişlerdir. Buna göre; CD38 negatif olan 7 olgunun yakınması yokken, 6 olguda ise hastalık ilişkili bir yakınmaya rastlanmıştır, sırasıyla %53,8 ve %46,2. CD38 pozitif olan 13 olguda yakınma saptanmamışken, 9 olguda ise yakınma olduğu bulunmuştur, sırasıyla %59,1 ve %40,9. CD38 ekspresyonunun analiz edildiği dönemde hatanın yakınmasının olup olmaması arasında istatistiki bir ilişki saptanamamıştır (p=0,762).

LDH düzeyleri için de benzer sonuçlar elde dilmiştir. CD38 ekspresyonu negatif olan 15 olguda LDH normal ve 2 olguda ise yüksek bulunmuştur, sırasıyla %88,2 ve %11,8. Buna karşın CD38 ekspresyonu pozitif olan 23 olguda LDH normal saptanırken 11 olguya da LDH yüksekliği eşlik etmiştir, sırasıyla %67,6 ve %32,4. Ancak her iki parametre arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0,175).

CD38 ekspresyonu negatif olan 15 olguda UA düzeyleri de normalken, sadece 2 olguda yüksek bulunmuştur, sırasıyla %88,2 ve %11,8. Bununla birlikte, CD38 ekspresyonu pozitif olan 30 olguda UA normalken, sadece 4 olguda yüksek bulunmuştur, sırasıyla %88,2 ve %11,8. CD38 ekspresyonu ile UA düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (p=1,000).

Anemi varlığı ile CD38 ekspresyonu karşılaştırıldığında ise; 13 tane CD38 negatif olguda anemi yokken, yalnızca 4 olguda saptanmıştır, sırasıyla %76,5 ve %23,5. Bununla birlikte, 29 tane CD38 pozitif olguda anemi bulunamamış ve fakat yalnızca 5 olguda anemiye rastlanmıştır, sırasıyla %85,3 ve %14,7. Ancak CD38 ekspresyonu ile anemi varlığı arasında da bir ilişki bulunamamıştır (p=0,459).

CD38 analizinin yapıldığı süreçte olguların tedavi alıp almadıkları da değerlendirilmiştir. CD38 ekspresyonu negatif saptanan 13 olgunun 10'u tedavi almazken 3 olgunun tedavi altında olduğu saptanmıştır, sırasıyla %76,9 ve %23,1. Buna karşın CD38 ekspresyonu pozitif saptanmış 22 olgunun 12'sinde tedavi gereksinmesinin olmadığı ve 10'unda ise tedavi verildiği saptanmasına karşın, sırasıyla %54,5 ve %45,5; aralarında istatistiki bir fark saptanamamıştır (p=0,282).

Son olarak CD38 ekspresyonu ile analizin yapıldığı güncel dönemdeki tedavi gereksinmesi de karşılaştırılmıştır. CD38 negatif 13 olgudan 11'ine tedavi verilmezken, 2'sine ise tedavi uygulanmakta olduğu görülmüştür, sırasıyla %84,6 ve %15,4. Buna karşın CD38 ekspresyonu pozitif olan 22 olgudan 14'ü tedavisiz

izlenmekteyken, 8'inin halihazırda tedavi aldığı saptanmıştır, sırasıyla %63,6 ve %36,4. CD38 ekspresyonu ile güncel tedavi durumu arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (p=0,259).

Tablo: CD38 Ekspresyonu İle Diğer Klinik ve Laboratuvar Parametrelerinin Karşılaştırılması

PARAMETRE	CD38		İSTATİSTİK
Cinsiyet	NEGATİF	POZİTİF	p=1,000
Yakınma	NEGATİF	POZİTİF	p=0,762
LDH - UA	NEGATİF	POZİTİF	p=0,175 p=1,000
Anemi	NEGATİF	POZİTİF	p=0,459
Tedavi	NEGATİF	POZİTİF	p=0,282
Güncel Tedavi	NEGATİF	POZİTİF	p=0,259

ZAP-70 ve CD38 Ekspresyonlarının Uyumu

ZAP-70 ve CD38 ekspresyonlarının birbiriyle uyumlu olup olmadıkları analiz edilmiştir. Burada amaç, birbirlerinin ekspresyonlarına aynı yönde eşlik edip etmediklerinin belirlenmesidir. Sonuçta; ZAP-70 negatif olan 15 olgunun CD38 negatif ve ZAP-70 pozitif olan 13 olgunun CD38 pozitif olduğu, buna karşın; ZAP-70 negatif olan 21 olgunun CD38 pozitif ve ZAP-70 pozitif olan 2 olgunun ise CD38 negatif olduğu bulunmuştur. Kappa testi ile yapılan istatistiki değerlendirmede, aralarında uyum olmadığı görülmüştür.

TARTIŞMA

Tüm B hücre maligniteleri aynı ortak hücre dizi gelişim yolunu paylaşmalarına karşın, birbirlerinden farklı klinik, laboratuvar, molekuler ve genetik özellikler içeren bir spekturumda yerleşmişlerdir (33). KLL ise, on yıllar boyunca, yakın zamana kadar, "yaşlılık çağı hastalığı" olarak bilinip, tedavisinde "bekle gör" politikasının izlendiği, görece yavaş seyirli bir antite olarak bu grup altında yer bulmuştur. Genellikle olguların yarısından çoğunun klinik semptomsuz oldukları gerçeğinin temel oluşturduğu bu görüş, tedavi seçiminde de hastalara minimal toksisite yaratacak şekilde -ve gerekiyorsa tedavisiz- davranılmasını gerektirmiştir. Ancak son beş yılda KLL ve dahası prognostik kriterler üzerine yapılmış çalışmalarda elde edilen veriler, akla yeni soruları getirmiştir. Şöyle ki: Erken evredeki hangi hastalar tedaviyi hak etmektedir? Hangi hastalar daha agressif tedavi almalıdırlar? Hangi olgular, kök hücre transplantasyonuna yönlendirilmelidirler? Kuşkusuz tüm bu sorulara yanıt vermek, hastalığın prognostik belirteçlerinin iyi analiz edilmesi ve hangilerinin sağ kalım üzerinde ne derecede etkili olduğunun belirlenmesi ile olasıdır.

Son zamanlarda KLL üzerine yapılan çalışmalarda prognozla ilişkili veriler elde edilirken, belki de daha heyecan verici olarak hastalığın biyolojisinde de farklı yaklaşımlar ortaya çıkarılmıştır. Gerek BCR, gerekse bellek hücreleri ve viral ajanlara devamlı maruziyet konusundaki bulgular; hastalığın immatur ve yavaş çoğalan lenfositlerin birikimi yönündeki tanımlanmasını değiştirerek, iki farklı grubun egemen olduğu ve apoptozisden korunmuş olgun bellek hücrelerinin ya da proliferasyonun değişik aşamalarında bulunan ve yine apoptozisden korunmuş B hücrelerinin egemenliğinden söz edilmesine yol açmıştır (34).

KLL'nin en önemli özelliklerinden bir tanesinin klinik heterojenite olduğu gerçektir (35). Tüm dünyada kabul gören, gerek Binet ve gerekse Rai evreleme sistemleri tedavi kararı vermede halihazırda ilk gözetilen kriterler olmasına karşın, klinik seyrin belirlenmesinde her zaman için güvenilir birer dayanak olmadıkları görüşü gittikçe taraftar bulmaktadır. Pek çok hasta sessiz seyirli bir kliniğe sahip olup tedavi gerektirmezken, başkaları ise oldukça agressif bir klinik akıbete sahiptirler (4). Genellikle bilinmektedir ki, erken evrede olan yani düşük

malign yüke sahip olgular -düşük tümöral yüke sahip olgular- kemoterapiden -örneğin klorambusil- yarar görmezler. Bununla birlikte; asemptomatik olup ve fakat hızla progres göstereceği tahmin edilebilen erken evredeki olgulara belki "purine" analogları ya da monoklonal antikorlar gibi remisyona sokma potansiyeli olan tedavilerin ilk seçenek ve erkenden uygulanması düşüncesi akla getirilmelidir. Dolayısıyla bu tip hastaların belirlenmesi-tanımlanması gittikçe önem kazanan bir antite olmaktadır.

İmmünoglobulin ağır zincir geninin değişken bölgesinin unmutasyonal olması, ister erken ve isterse ileri evredeki olgularda kötü bir prognostik göstergedir. Yapılan "multivariate" analizlerde IgVH gen mutasyonal durumunun en iyi klinik akıbet belirleyici marker olduğu saptanmıştır (4). Bununla birlikte bu test, zor, pahalı ve rutinde uygulamaya uygun değildir. Ancak şimdiye kadar yapılmış birkaç çalışmada ZAP-70 ekspresyonu ile IGVH gen mutasyonal durumu arasında %77'den >%90'a kadar varan ölçülerde bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (35). Buna ek olarak ZAP-70 overekspresyonunun kısa sağ kalımı işaret ettiğine ilişkin kanıtlar sunan çalışmalar da vardır (35).

Biz de bu noktadan hareketle KLL olgularında izlemlerinin herhangi bir dönemlerinde -ister tanı sırasında ve isterse başka bir süreçte- tedavi alıp almadıklarına bakmaksızın, akım sitometrik olarak ZAP-70 ve ek olarak CD38 ekspresyonunu analiz ederek bunları diğer klinik ve laboratuvar özelliklerle karşılaştırmak istedik. Toplam 51 adet olgunun akım sitometrik incelemesine ulaşırken, bu sayı farklı parametreler için değişiklikler göstermekteydi. Bunlar tabloda sunulmuştur.

Tablo: Parametrelere göre olgu sayılarının dağılımı

Parametre	Toplam	Yaş/Cins	Tanıdaki Evre	Akım Sitometrisi Analizindeki Evre	Yakınma	LDH UA Anemi	Tedavi
Olgu Sayısı	51	51	32	35	35	51	35

Çalışmamızın sonuçlarını dört bölümde incelemeyi uygun gördük: Bunlardan birincisi "Tanı Sırasında Evre ve Diğer Bilgilerine Ulaşılan Olgular", ikincisi "Akım Sitometrik Çalışmanın Yapıldığı Süreçteki Evre ve Diğer Parametrelerin Analizi", üçüncüsü "ZAP-70 Ekspresyonu İle Diğer Klinik ve

Laboratuvar Parametrelerinin Karşılaştırılması" ve dördüncüsü ise "CD38 Ekspresyonu İle Diğer Klinik ve Laboratuvar Parametrelerinin Karşılaştırılması"

Tanı Sırasında Evre ve Diğer Bilgilerine Ulaşılan Olgular

Toplam 51 olgunun 32'sinde hastalığa tanı konulduğu süreçteki bilgilere ulaşma olanağı bulduk. Olguların evre durumlarıyla ZAP-70 ekspresyonlarının karşılaştırılmasında anlamlı bir ilişki saptayamadık. Buna benzer olarak CD38 ekspresyonlarının da evre durumuna göre farklı bir prezentasyonunu belirleyemedik. Kötü klinik seyirle ilişkili olan ZAP-70 -ve bazı yayınlara göre CD38- ekspresyonunun daha kısa sağ kalıma sahip ileri evreyle birlikteliği beklenmekteyse de, çalışmamızda ileri evredeki bu olgularda tedavi gereksinmesinin erken evreye göre istatistiki olarak farklı -yüksek- çıkması (p=0,003) ve yine ileri evredeki bu olgularda anemi varlığının erken evredekilere göre anlamlı olarak farklı (p=0,06) çıkması bir bakıma evreleme sisteminin halihazırda geçerli olan prognostik önemini bir kez daha ortaya koymaktadır. Değerlendirme sonucunda; özellikle evre ve tedavi gereksinmesinin birlikteliğinin anlamlı çıkması, NCI tarafından belirlenen ve yayınlanan "KLL'de tedavi endikasyonları"na da uymaktadır (16).

Akım Sitometrik Çalışmanın Yapıldığı Süreçteki Evre ve Diğer Parametrelerin Analizi

Hastaların değerlendirilmesinde temel olarak alınan gerek ZAP-70 ve gerekse CD38 ekspresyonlarının analiz edildiği "akım sitometrisinin çalışıldığı dönemdir". Homojenizasyon ve objektivite gözetilerek, çalışmanın amacında olmayan "izlem" parametresi de göz ardı edilerek, hastalık süreçlerinin bir bölümünde ZAP-70 ve CD38 ekspresyonları tayin edilmiş olguların bu döneme ait evre ve klinik-laboratuvar özellikleri birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Belirtilen bu döneme ait bilgilerine ulaşılan toplam olarak 35 olgu saptanmıştır. Bu olguların erken evrede olanlarında herhangi bir yakınmaya rastlanmazken, ileri evreye sahip olanların belirgin yakınmalarının olduğu görülmüştür (p=0,036). Bununla ilişkili olarak, tedavi gereksinmesinin de ileri evredeki olgularda anlamlı biçimde yüksek bulunduğu görülmüştür (p=0,046). Her iki parametreye de ZAP-70 ve CD38 ekspresyonlarının eşlik etmemesi dikkat çekicidir.

ZAP-70 Ekspresyonu İle Diğer Klinik ve Laboratuvar Parametrelerinin Karşılaştırılması

51 olgunun ZAP-70 ekspresyonu tespit edilerek, aynı süreçteki diğer parametrelerle karşılaştırılmıştır. 35 hastanın bilgilerine ulaşılabilen değerlendirme sonucunda, hastaları doktora getiren KLL ile ilişkili herhangi bir yakınma varlığı ile kötü prognostik seyrin bir belirteci olan ZAP-70 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (p=0,027). Daha önceki bölümde vurgulanan, ileri evre ile yakınma arasında çıkan anlamlı ilişki burada da kendini ZAP-70 ile birlikte göstermektedir. İlginç bir diğer sonuç ise; ZAP-70 overekspresyonu saptananların izlem sürelerinin güncel aşamasında tedavi almakta olduklarıdır (p=0,004). Zaten son zamanlarda daha fazla araştırıcı tarafından söylene geldiği gibi, uzun süreli akıbeti saptamada, evreleme sistemlerinden çok "IgVH gen durumu" ya da onunla korele olan "ZAP-70 ekspresyonunun" daha fazla belirleyici oldukları yönündeki görüşe paralel olarak, biz de değerlendirmemizin sonucunda güncel tedavi gereksinmesinin öngörülmesinde ne tanı sırasındaki ve ne de akım sitometrisi çalışıldığı sıradaki evre durumunun değil sadece ZAP-70 ekspresyonunun belirleyici olduğunu saptadık.

CD38 Ekspresyonu İle Diğer Klinik ve Laboratuvar Parametrelerinin Karşılaştırılması

Malavasi ve ark.nın 1994 yılında yayınlanan makalelerinde, lösemik gelişimde erken differansiyasyon aşamalarında kalmış ve ölümsüz olan hücrelerde CD38 ekspresyonuna rastlanırken, daha differansiye hücrelerde ise bu ekspresyonun olmadığı belirtilmiştir (36). Son yıllarda ise KLL'yi de içeren pek çok lösemi tipinde akıbet ve hastalık progresyonu ile ilgili olarak CD38 ekspresyonundan da söz edilmektedir (20). Biz de projemizde CD38 ekspresyonunu toplam 51 olguda analiz ederek diğer parametrelerle karşılaştırdık. Ancak bu markerın overekspresyonu ile diğer klinik ve laboratuvar özelliklerinden hiçbirisinin anlamlı bir ilişkisini saptayamadık. Damle ve ark.ı çalışmalarında "Rai intermediate" risk grubunda olup da CD38 ekspresyonu %30'un üzerinde olan olguların kötü klinik gidişe sahip olduklarını açıklamalarına karşın, Heintel ve ark. ise bizim sonuçlarımıza benzer olarak CD38 pozitifliği ile erken evredeki kötü klinik seyir arasında bir ilişki saptamamışlardır (20).

SONUÇ

Kronik lenfositer löseminin, IgVH mutasyonal durumuna göre iki alt gruba ayrıldığı ve bunlardan mutasyon form içermeyen grubun klinik progresyon, görece ileri evre ve kısa sağ kalım gibi daha agressif hastalık özelliklerine sahip olduğu, yakın zamana dayanan çalışmalarda gösterilmiştir (19). Dahası, DNA microarray analizleriyle, ZAP-70 ekspresyonunun unmutasyonal form içeren olgu grubunda daha yüksek olduğu saptanmıştır (37). Son iki yılda ardı ardına yapılan geniş serili çalışmalarda ise, ZAP-70 ekspresyonunun mutasyonal durumun bir göstergesi olduğu ve ayrıca kendi başına hastalık progresyonu ile sağ kalım konularında yararlanılabilecek bir prognostik marker olabileceği belirtilmektedir (4, 30). Normalde, T lenfosit ve NK hücrelerinin eksprese ettiği bilinen ZAP-70'in lösemik B KLL hücrelerinde de eksprese olduğunun anlaşılmasını takiben hız kazanan bu tirozin kinaz üzerindeki çalışmalardan birisinde, ZAP-70 varlığı, lösemik hücrelerin yanı sıra normal lenfoid dokularda yerleşmiş lenfositlerde de saptanmıştır (23). Daha da ilginci, Herishanu ve ark.nın bir çalışmasında, KLL olgularında B lösemik hücrelerdeki ZAP-70 overekspresyonuna hasta olgulardan elde edilen T lenfositlerdeki ZAP-70 overekspresyonunun eşlik ettiğinin gösterilmesidir (37).

Tüm bunların yanında ZAP-70 ve CD38'in akım sitometrik analizlerinin birlikte yapılarak, bunları yakınma, LDH, UA ile birlikte tedavi gereksinmesi ve evre durumuyla karşılaştıran bir çalışma daha literatürde bulunamamıştır. Bu noktadan hareketle biz de, tanı zamanına ve tedavi alıp almadıklarına bakmaksızın, hasta seçiminde yalnızca akım sitometrik olarak herhangi bir dönemde ZAP-70 ve CD38 ekspresyonlarının analiz edilmiş olmasını gözeterek, KLL olgularında geriye dönük olarak bu ekspresyonları, cinsiyet, yaş, evre durumu, analizin yapıldığı dönemdeki yakınma-LDH-UA-tedavi, herhangi bir süreçteki tedavi ve güncel tedavi durumlarıyla karşılaştırdık. 51 adet akım sitometrik sonuca karşılık her hastanın tüm parametrelerine ulaşılamamasından kaynaklanan sorunlardan ötürü analizi yapılan diğer özellikler her zaman aynı sayıda olmadı. Buna karşın; ileri evredeki hastalarda tedavi uygulanma durumu ile anemi varlığının erken evredekilere göre birlikte yüksek bulunması hem evreleme sistemi ile korelasyon göstermesi ve hem de NCI'nin 1996 yılında yeniden gözden geçirerek önerdiği "tedavi endikasyonları"

şemasına uyması bakımından önensenmesi gereken bir sonuç olarak durmaktadır (16).

Olguların ZAP-70 ve CD38 ekspresyonlarının analiz edildiği döneme ait diğer parametreleriyle ilişkisine bakıldığında da, karşımıza, ileri evredeki olguların yakınmaları ve tedavi gereksinmelerinin erken evredekilerden anlamlı bir şekilde yüksek olduğu çıkmaktadır. Bir önceki sonuçla uyumlu olmasının yanında, neredeyse %50 olgudan fazlasında asemptomatik olan bu hastalıkta, hastayı doktora getiren herhangi bir yakınma varlığının ileri evreyle birlikteliğinin tespiti belki de pratik uygulamada tedavi öngörüsü için yol gösterici olabilecektir. Bu sonuca özgü olmak üzere literatürde herhangi bir yaklaşıma rastlanmamış olması da ilginçtir.

Analiz gruplarımızdan bir diğerinde ise, ZAP-70 overekspresyonu ile hastaların "yakınma ve güncel tedavi gereksinmelerinin birlikteliği" saptanmıştır. KLL'de tedavi seçiminde klinik evrenin yanında, lenfosit ikilenme zamanı, Kİ infiltrasyonunun doğası, beta 2 mikroglubulin, timidin kinaz, CD23 ve son yayınlarda desteklendiği gibi CD38 ekspresyonlarının düzeyi de göz önünde tutularak karar verilmesi gerektiği bilinmektedir (7). Bununla birlikte, IgVH gen mutasyonal durumu ve ZAP-70 ekspresyon düzeyleri ise son yıllarda önem kazanan ve gelecekte tedavi seçiminde ilk gözetilecek kavramlar olmaya aday parametrelerdir. Klinisyenin -hele de hastanın genç olması durumunda- tüm bu sayılanları gözeterek ve özellikle erken evredeki hastalarda pozitifliklerini dikkate alarak, tedavi planını öngörmesi gerekmektedir (7). Bu karara yardımcı olacak iki parametre ise çalışmamızda belirmiştir: Yakınmayla başvuran hastalarda ZAP-70 ekspresyonu yüksek bulunmuştur. Dolayısıyla, genellikle asemptomatik olan bu hastalık grubunda hastayı doktora getiren bir yakınmanın varlığı bile kötü klinik seyrin göstergesi ZAP-70 overekspresyonuyla birliktelik göstermektedir. Dahası bu hastaların, izlem süreçlerinin herhangi bir döneminde -çalışmamızda aradaki süre dikkate alınmamıştır- tedaviye gerek duyacak olmaları, ZAP-70 ekspresyonunun saptandığı dönemde -yakınmayla başvuran bu hastalara- daha agressif bir tedavi sunulması düşüncesini doğurmakta ve desteklemektedir.

Geriye dönük yapılan bu analizlerde olguların gerek ZAP-70, CD38 ekspresyonları ve gerekse evre ile diğer parametreleri arasında anlamlı bir ilişki saptanamamış olması ilginçtir. Mainou-Fowler ve ark.nın kesin yargısında; CD38

ekspresyonu KLL'de "excellent" bir prognostik marker olup, rutin uygulamalarda kullanılmalıdır; denmektedir (20). IgVH gen mutasyonal durumuyla korelasyonu araştırıldığında ise ZAP-70'in gerisinde kaldığı ve sonuç olarak bağımsız bir belirleyici olduğu söylenmektedir. Oscier ve ark. da bizim sonuçlarımıza benzer olarak, erken evre -Binet A- olgulardaki CD38 ekspresyonu ilişkisinde anlamlı bir fark bulamamışlardır (38).

Catovsky ve ark.nın (35) ZAP-70 ve CD38 ekspresyonları arasında tespit ettikleri anlamlı ilişkiye karşın, hastalarımızda bu iki prognostik markerın uyumlu olmadığının saptanması Gibbs ve ark.nın 33 hasta ile yaptıkları çalışma sonuçlarıyla benzeşmektedir (29). Bu çalışmada CD38 ekspresyonunun ZAP-70 ile korelasyon göstermemesi yanında IgVH mutasyonal durumundan da bağımsız olduğu belirtilmektedir.

Az sayıda olguda ve izlem süreleri gözetilmeden yapılan bu analiz, literatürde olmayan bazı -yakınma, LDH, UA, aneminin birlikte analizi- parametrelerin değerlendirilmiş olması yönünden değerlidir. Özellikle ZAP-70 ekspresyonunun pozitif olduğu olguların yakınmayla başvuran hastalar olması ve dahası bunların izlem sürelerinin sonunda -güncel- tedavi almakta olduklarının tespiti belki de bu tirozin kinazın tetkik edildiği süreçte hastalara daha agressif tedavi uygulanması düşüncesini doğurmaktadır.

Elde ettiğimiz bu sonuçlar, hastalarımızın ZAP-70 ve CD38 ekspresyonları üzerine yaptığımız ilk değerlendirmeyi yansıtmaktadır. Bu projeden elde edilen görgü, deneyim ve veriler; gelecekte, daha fazla sayıda olguda, izlem süresini de gözeterek, gerek akım sitometrik ve gerekse moleküler yöntemlerle ZAP-70 ekspresyonunu IgVH gen mutasyonal durumuyla birlikte analiz ederek prognostik bir parametre elde etmek ve dahası ZAP-70'in aktif formu olan fosforile ZAP-70 varlığının KLL'nin sözü edilen farklı alt gruplarında analizini yapmak temelinde sürüp gidecek olan çalışmalarımıza hareket kaynağı ve tetikleyici bir güç olacaktır.

ÖZET

Kronik Lenfositer Lösemi Olgularında ZAP-70 Ekspresyonunun Akım Sitometrik Analizi

Kronik lenfositer lösemi, en sık görülen B lenfoproliferatif hastalık olmakla birlikte fizyopatolojik ve onkojenik yolağı henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Oldukça değişken özelliklere sahip bir klinik spektrumu vardır. Bazı olgularda hızla ileri evrelere geçiş izlenirken, bazılarında ise hastalık progresyonu olmadan, uzun süren bir sağ kalıma rastlanmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmanın da başlangıç noktasını oluşturduğu gibi; KLL'de kişiden kişiye farklılık gösteren, önceden kestirilmesi zor olan ve zaman zaman evreleme sistemlerine ters düşen bir klinik seyir izlenebilmektedir. Bu da hastalığın prognostik belirleyicilerinin saptanmasının önemini bir kat daha arttırmaktadır.

Prognostik belirleyicilere ilişkin yaygın kabul gören önerme ise açıktır: Unmutasyonal gen yapısı taşıyan olgular normalde ZAP-70 eksprese ederler ve bunlar hızlı klinik seyir, erken süreçte tedavi gereksinmesi, kısa sağ kalım gibi kötü biyolojik özelliklerle birliktedirler. Oysa; mutasyonal tipte IgVH genetik yapısını barındıran olgularda ZAP-70 ekspresyonuna "genellikle" rastlanmaz ve bunlar diğerinin tersine yavaş klinik seyir, uzun süre tedavisiz süreç, uzun sağ kalım gibi iyi klinikopatolojik özelliklere sahiptirler. IgVH gen mutasyonal durumunu belirlemeye yönelik çalışmalar zor, pahalı ve rutinde standardizasyonu tam olarak yerleştirilememiş durumdadır. Bunun yerine "vekil" belirleyici olarak ZAP-70 ekspresyonunun tetkik edilmesi ise daha kolay ve uygulanabilirdir.

Biz de bu noktadan hareketle tanı zamanına ve tedavi alıp almadıklarına bakmaksızın, hasta seçiminde yalnızca akım sitometrik olarak herhangi bir dönemde ZAP-70 ve CD38 ekspresyonlarının analiz edilmiş olmasını gözeterek, KLL olgularında geriye dönük olarak bu ekspresyonları, cinsiyet, yaş, evre durumu, analizin yapıldığı dönemdeki yakınma-LDH-UA-tedavi, herhangi bir süreçteki tedavi ve güncel tedavi durumlarıyla karşılaştırdık.

Az sayıda olguda ve izlem süreleri gözetilmeden yapılan bu analiz, literatürde olmayan bazı parametrelerin değerlendirilmiş olması yönünden değerlidir. Özellikle ZAP-70 ekspresyonunun pozitif olduğu olguların yakınmayla başvuran hastalar olması ve dahası bunların izlem sürelerinin sonunda -güncel- tedavi almakta olduklarının tespiti, belki de bu tirozin kinazın tetkik edildiği süreçte hastalara daha agressif tedavi uygulanması düşüncesini doğurmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Akım sitometrisi, KLL, CD38, prognostik belirleyiciler, ZAP-70

SUMMARY

Flow Cytometric Analysis of ZAP-70 Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients

Although chronic lymphocytic leukemia (CLL) is one of the most prevalent hematological malignancies, the oncogenic pathway is poorly understood. The clinical course of CLL is heterogeneous: many patients have indolent disease that never needs treatment, but others have an aggressive clinical outcome. Although staging systems stil dictate management, it is not always possible to predict within early-stage CLL, which comprises approximately 50% of diagnosis, those patients who are likely to progress and those who will remian with stable disease for decades.

CLL patients with unmutated IgVH genes normally express ZAP-70, have unfavourable biological features with rapid clinical progression, require treatment and have short survival times. Conversely, CLL patients with mutated IgVH genes usually do not express ZAP-70, present with non-adverse clinicopathological features, do not require therapy for long periods of time and have a long survival. Unfortunately, VH mutation analysis is complex, expensive, time consuming and not routinely undertaken in most laboratories. Therefore, ZAP-70 analysis has been proposed as a useful surrogate marker for IgVH mutational status in CLL.

We analyzed ZAP-70 and CD38 expressions in CLL cells from a series of patients using flow cytometry and correlated the results with the other clinical-biological features -sex, age, disease stage, symptomes, LDH, UA, anemia, treatment-.

We found that ZAP-70 was expressed more frequently in patients with symptomes at the time of analysis and in patients require treatment currently.

It is suggested that the measurement of the ZAP-70 expression in association with other biological parameters are used to develop a prognostic profile that will assist in treatment decisions for patients in the time of diagnosis.

Key Words: CD38, CLL, flow cytometry, prognostic parameters, ZAP-70

KAYNAKLAR

1) Johnston JB. Chronic Lymphocytic Leukemia. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, et al., eds. Wintrobe's Clinical Hematology. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004: 2429-2463.
2) Rawstron A, Hillmen P, Houlston R. Clonal Lymphocytes in Persons Without Known Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Implications of Recent Findings in Family members of CLL Patients. Seminars in Hematology 2004; 41 (3): 192-200.
3) Hematology, The European Hematology Association Education Program, 10th Congress of the EHA. Stockholm, Sweden, June 2-5, 2005; 192-205.
4) Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. Lancet 2004; 363: 105-111.
5) Kokhaei P, Palma M, Mellstedt H, et al. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. Annals of Oncology 2005; 16 (Supplement 2): 113-123.
6) Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Mechanism of Disease: Chronic Lymphocytic Leukemia. N Engl J Med 2005; 352: 804-815.
7) Herishanu Y, Polliack A. Chronic lymphocytic leukemia: A review of some new aspects of the biology, factors influencing prognosis and therapeutic options. Transfusion and Apheresis Science 2005; 32: 85-97.
8) Sgambati MT, Linet MS, Devesa SS. Chronic lymphocytic leukemia: epidemiological, familial and genetic aspects. In: Cheson BD, ed. Chronic lymphoid leukemias, 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc, 2001:33-62.
9) Houlston RS, Catovsky D, Yuille MR. Genetic susceptibility to chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 2002; 16: 1008-1014.
10) Ishibe N, Sgambati MT, Fontaine L, et al. Clinical characteristics of familial B-CLL in the National Cancer Institute Familial Registry. Leuk Lymphoma 2001; 42: 99-108.
11) Capalbo S, Trerotoli P, Ciancio A, et al. Increased risk of lymphoproliferative disorders in relatives of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia:

relevance of the degree of familial linkage. Eur J Haematol 2000; 65: 114-117.

12) Pettitt AR, Sherrington PD, Stewart G, et al. P53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation. Blood 2001; 98: 814-822.

13) Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. J Exp Med 2001; 194: 1625-1638.

14) Chronic lymphocytic leukemia: recommendations for diagnosis, staging and response criteria. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Ann Intern Med 1989; 110(3): 236-8.

15) Cheson BD, Bennett JM, Rai KR, et al. Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia: recommendations of the National Cancer Institute-sponsored working group. Am J Hematol 1988; 29(3): 152-63.

16) Oscier D, Fegan C, Hillmen P, et al. Guidelines on the diagnosis and managements of chronic lymphocytic leukaemia. British Journal of Haematology 2004; 125: 294-317.

17) Wagner SD, Cwynarski K. Chronic lymphocytic leukaemia: new biological markers for assessing prognosis. The Hematology Journal 2004; 5: 197-201.

18) Stilgenbauer S, Lichter P, Dohner H. Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. Rev Clin Exp Hematol 2000; 4(1): 48-72.

19) Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999; 94(6): 1848-1854.

20) Mainou-Fowler T, Dignum HM, Proctor SJ, et al. The Prognostic Value of CD38 Expression and its Quantification in B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL). Leuk Lymphoma 2004; 45(3): 455-462.

21) Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999; 94: 1840-1847.

22) Carreras J, Villamor N, Colomo L, et al. Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in B-cell lymphoid neoplasms. J Pathol 2005; 205: 507-513.

23) Nolz JC, Tschumper RC, Pittner BT, et al. ZAP-70 is expressed by a subset of normal human B-lymphocytes displaying an activated phenotype. Leukemia 2005; 19: 1018-1024.

24) Chan AC, Iwashima M, Turck CW, et al. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. Cell 1992; 71: 649-662.

25) Schweighoffer E, Vanes L, Mathiot A, et al. Unexpected requirement for ZAP-70 in pre-B cell development and allelic exclusion. Immunity 2003; 18: 523-533.

26) Chen L, Widhopft G, Huynh L, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2002; 100: 4609-4614.

27) Chen L, Apgar J, Huynh L, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2005; 105: 2036-2041.

28) Kim SZ, Chow KU, Kukoc-Zivojnov N, et al. Expression of ZAP-70 Protein Correlates with Disease Stage in Chronic Lymphocytic Leukemia and is Associated with, but not Generally Restricted to, Non-mutated Ig VH Status. Leuk Lymphoma 2004; 45(10): 2037-2045.

29) Gibbs G, Bromidge T, Howe D, et al. Comparison of flow cytometric methods for the measurement of ZAP-70 expression in a routine diagnostic laboratory. Clin Lab Haem 2005; 27: 258-266.

30) Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 Expression as a Surrogate for Immunoglobulin-Variable-Region Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. N Engl J Med 2003; 348: 1764-1775.

31) Corcoran M, Parker A, Orchard J, et al. ZAP-70 methylation status is associated with ZAP-70 expression status in chronic lymphocytic leukemia. Haematologica/The Hematology Journal 2005; 90(8): 1078-1088.

32) Castro JE, Prada CE, Loria O, et al. ZAP-70 is a novel conditional heat shock protein 90 (Hsp90) client: inhibition of Hsp90 leads to ZAP-70 degradation,

apoptosis and impaired signaling in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2005; 106: 2506-2512.

33) Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. Blood 2004; 103: 1202-1210.

34) Ferrarini M, Chiorazzi N. Recent Advances in the Molecular Biology and Immunobiology of Chronic Lymphocytic Leukemia. Seminars in Hematology 2004; 41(3): 207-223.

35) Del Giudice I, Morilla A, Osuji N, et al. Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. Cancer 6 oct 2005; article online in advance of print.

36) Malavasi F, Funaro A, Roggero S, et al. Human CD38: a glycoprotein in search of a function. Immunology Today 1994; 15:95-97.

37) Herishanu Y, Kay S, Rogowski O, et al. T-cell ZAP-70 overexpression in chronic lymphocytic leukemia (CLL) correlates with CLL cell ZAP-70 levels, clinical stage and disease progression. Leukemia 21 april 2005; advance online publication: 1-3.

38) Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. Blood 2002; 100: 1177-1184.