

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

HAIRY CELL LÖSEMİ OLGULARINDA B-RAF MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Aybüke OLGUN

İZMİR 2014

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

HAIRY CELL LÖSEMİ OLGULARINDA B-RAF MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Aybüke OLGUN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet Ali ÖZCAN

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitim ve öğrenimim süresince her konuda bilgi ve deneyimlerini paylaşan ve tez hazırlama sürecinde çalışmanın planlanması, uygulanması ve sonuçlandırılmasında sonsuz sabrıyla desteğini esirgemeyen, Hematolojiye olan ilgi ve merakımı uyandıran, tez danışman hocam Prof. Dr. Mehmet Ali Özcan'a;

Tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle yardımlarını esirgemeyen, bir abla şevkatiyle yol gösteren Doç. Dr. İnci Alacacıoğlu'na,

İç Hastalıkları uzmanlığım sürecinde mesleki gelişimime katkıda bulunan tüm İç Hastalıkları Anabilim Dalı Üyeleri ve Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fatoş Önen'e,

Tezime katkılarından dolayı Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Yasemin Baskın'a,

Uzmanlık öğrenciliğim süresince yanımda olan, çalışma hayatının onlarla güzelleştiği dostlarım Dr. Aslıgül Dünya, Dr. Tuğba Başoğlu, Dr. Özge Dokuzlar, Dr. Rukiye Arıkan ve yola beraber başladığım şimdi uzaklarda devlet yükümlülüğü görevlerini sürdürmekte olan tüm eş kıdemdeki arkadaşlarıma,

Değerli tüm çalışma arkadaşlarıma, hemşire, sekreter ve yardımcı sağlık personeline,

Akademik ve manevi anlamda desteğini asla esirgemeyen ikinci ailem Nur Olgun ve Levent Olgun'a,

Olmasalar burada olamazdım; sonsuz destek ve sevgileriyle her zaman yanımda olan, fedakarlıkları hiç tükenmeyen canım annem, babam ve ağabeyime,

Son olarak da hayatın iyi-kötü, tatlı-acı her anında yanımda olan hayat arkadaşım, biricik eşim Yüksel Olgun ve yaşam sevincimiz, ışığımız küçük Levent'ime;

sonsuz teşekkür ediyorum.

Saygılarımla

Dr. Aybüke Olgun

DEÜTF İç Hastalıkları

İZMİR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER.....	i
RESİM LİSTESİ.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	v
KISALTMALAR.....	vi
ÖZET	1
SUMMARY	3
1.GİRİŞ VE AMAÇ	5
2.GENEL BİLGİLER	7
2.1.HAIRY CELL LÖSEMİ	
2.1.1. Tanım	7
2.1.2. Epidemiyoloji	7
2.1.3. Klinik Bulgular	7
2.1.4. Tanı ve Histopatolojik Bulgular	8
2.1.5. Ayırıcı Tanı	14
2.1.6. Hairy Cell Lösemi Varyant Tip (HCL-V)	15
2.1.7. Tedavi.....	16
2.2.B-RAF	21
2.2.1. Tanım	21
2.2.2. RAF-MEK-ERK Yolağı.....	22

2.2.3. B-RAF Mutasyonları	22
2.2.4. B-RAF Mutasyonlarının Görüldüğü Kanserler	25
2.3. Hairy Cell Lösemi B-RAF İlişkisi.....	27
3.ARAŞTIRMA YÖNTEMİ	28
3.1. Hastalar.....	28
3.2. Tedavi	29
3.3. B-RAF Mutasyon Analizi	29
3.3.1. Pyrosekanslama Yöntemi	30
3.4. İstatistiksel Analiz.....	32
4.BULGULAR	33
4.1.Klinik Bulgular	33
4.2.Tedavi ve Yanıtları	34
4.3. B-RAF Mutasyon Analiz Sonuçları.....	34
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	38
6.KAYNAKLAR.....	42

RESİM LİSTESİ

Resim-1: Kemik iliği aspirasyon yaymasında HCL hücresi.

Resim-2: Kemik iliği aspirasyon yaymasında iki adet HCL hücresi.

Resim-3: Hairy cell lösemi, dalak kırmızı pulpa hemorajileri

Resim-4: Hairy cell lösemi diffüz kemik iliği infiltrasyonu

Resim-5: Hairy cell lösemi hücreleri, kemik iliğinde “pişmiş yumurta görünümü”

Resim-6: Hairy cell lösemi, kemik iliği infiltrasyonu

Resim-7: Hairy cell lösemi, kemik iliği infiltrasyonu

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil-1: MAPK Yolağı

Şekil-2: B-RAF yapısı

Şekil-3: DNA ters transkripsiyonu

Şekil-4: DNA polimeraz reaksiyonu

Şekil-5: ATP sülferez ve lusiferaz reaksiyonu

Şekil-6: Apiraz reaksiyonu

Şekil-7: Pyrosekans görüntüsü

Şekil-8: B-RAF kodon 600 wild tip pyrosekans görünümü

Şekil-9: B-RAF^{V600E} mutasyonu (1799 T>A) görünümü

Şekil-10: B-RAF 464-469 kodonları wild tip görünümü

Şekil-11: B-RAF^{G464E} mutasyonu (1391 G>A) görünümü

Şekil-12: B-RAF^{G466E} mutasyonu (1397 G>A) görünümü

Şekil-13: B-RAF^{G469V} mutasyonu (1406 G>T) görünümü

TABLO LİSTESİ

Tablo-1: Splenomegali ve kemik iliği tutulumuyla seyreden küçük B hücreli lenfoproliferatif bozuklukların immunhistokimyasal profilleri

Tablo-2: Hairy cell lösemi ayırıcı tanısı

Tablo-3: HCL ve HCL varyant tip ayrımı

Tablo-4: B-RAF Mutasyonu Görülen Kanserlerin Klinik Özellikleri

Tablo-5: Olgularımızın mutasyon analiz sonuçları

KISALTMALAR

A.B.D: Amerika Birleşik Devletleri

ADA: Adenozin Deaminaz

ADP: Adenozin Difosfat

AIF: Apoptoz İndükleyici Faktör

AMP: Adenozin Monofosfat

ANS: Absolut Nötrofil Sayısı

APS: Adenozin 5'- fosfosülfat

AS-PCR: Allel Spesifik-PCR

ATCL: Erişkin T Hücreli Lösemi

ATP: Adenozin Trifosfat

Bax (Bcl-2 Associated X)

Bcl-2: B Cell Lymphoma-2

CCD: Charge Coupled Device

COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancers

CR: Conserved Region

CRD: Cystine Rich Domain

DCF: Deoksikoformisin

dCK: Deoksitidin kinaz

DEÜTF: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

DNA: Deoksiribonükleik Asit

dNTP: Deoksiribonükleotid Trifosfat

ERK: Ekstrasellüler sinyal-Regüle Kinaz

FDA: Food Drug Administration

GTP: Guanozin Trifosfat

GTPaz: Guanozin Trifosfataz

Hb: Hemoglobin

HCL: Hairy Cell Lösemi

HCL-V: Hairy Cell Lösemi - Varyant

H&E: Hematoksilen & Eozin

HRMA: High Resolution Melting Analysis

IFN α : Interferon alfa

IFN β : Interferon Beta

IFN γ : Interferon Gama

I.V: Intravenöz

KLL: Küçük Lenfositik Lösemi

KY: Kısmi yanıt

MAPK: Mitojen Aktive Protein Kinaz

MCSF: Monosit Koloni Stimülan Faktör

MEK: MAP/ERK Kinaz

mIU: milliInter Unit

NCI: National Cancer Institute

NF- κ B: Nükleer Faktör-Kappa B

NK: Natural Killer

PCR: Polimerase Chain Reaction

pERK: Fosforilize ERK

PPI: Pirofosfat

RAF: Rapidly Accelerating Factor

RAS: RA_t Sarcoma

RBD: RAS Binding Domain

RNA: Ribonükleik asit

S.C: Subkutan

SLL: Küçük Lenfositik Lenfoma

SLVL: Splenic Lymphoma with Villous Lymphocytes

SMZL: Splenik Marjinal Zon Lenfoma

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

TKR: Tirozin Kinaz Reseptörü

TRAP: Tartarat Rezistan Asid Fosfataz

TY: Tam yanıt

WBC: White Blood Cell

WES: Whole Genome Sequencing

ÖZET

HAIRY CELL LÖSEMİ OLGULARINDA B-RAF MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Dr. Aybüke OLGUN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı

**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı 35340
İnciraltı/İzmir**

aybukeh.olgun@gmail.com

AMAÇ: Hairy cell lösemi lösemilerin %2-3'ünü oluşturan; dalak, kemik iliği ve karaciğerin lösemik infiltrasyonu ile seyreden kronik lenfoproliferatif bir bozukluktur. B-RAF hücre proliferasyonu ile ilişkili Mitojen Aktive Protein Kinaz yolağının önemli bir bileşeni olup, kanserlerde sık mutasyona uğrayan bir protein kinazdır. V600E en sık görülen B-RAF mutasyonudur. Hairy cell lösemi hastalarında yakın geçmişte yüksek oranda B-RAF^{V600E} mutasyonu gösterilmiştir. Çalışmamızda HCL hastalarında B-RAF^{V600E} ve B-RAF kodon 464-469 mutasyonlarının araştırılması ve klinik parametrelerle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

YÖNTEM: Araştırmamıza Ocak 2000-Aralık 2013 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Polikliniği'nde takip edilmiş 13 HCL hastası dahil edildi. Olguların demografik ve klinik verileri elde edildi. B-RAF mutasyonları pyrosekans temelli moleküler metodlarla değerlendirildi.

BULGULAR: B-RAF^{V600E} mutasyonu 10(%76,9) hastada pozitif bulundu. Bir hastada B-RAF^{G464E}, bir hastada B-RAF^{G466E}, bir hastada B-RAF^{G469E} mutasyonu saptandı. İki hastada her iki mutasyon pozitif. Bu hastaların klinik özelliklerine bakıldığında, diğer hastalara göre dikkat çekici bir farklılık görülmedi. Lenfadenopati saptanan hastaların tümünde B-RAF^{V600E} mutasyonu pozitif (p=1.000) Tedavi yanıtları B-RAF^{V600E} ve/veya B-RAF 464-469 kodon mutasyonları olan ve olmayan gruplarda benzerdi.

SONUÇ: B-RAF hairy cell lösemide yüksek sıklıkta ve değişik tipte mutasyonlara maruz kalabilen bir gendir. Özellikle B-RAF^{V600E} mutasyonunun hastalığın tanısını

destekleyen bir test olarak, tanının tartışmalı olduğu olgularda veya diğer periferik B hücreli neoplazilerin ayırıcı tanısında kullanılabilir. Geleneksel tedavilere yanıt vermeyen hedef tedavilerin uygulanabileceği hastaları ayıracak bir belirteç olabilir.

ANAHTAR KELİMELEER: Hairy cell lösemi, B-RAF^{V600E}, B-RAF^{G464E}, B-RAF^{G466E}, B-RAF^{G469E}

SUMMARY

INVESTIGATION OF B-RAF MUTATIONS IN HAIRY CELL LEUKEMIA PATIENTS

Aybüke OLGUN M.D.

Dokuz Eylul University School of Medicine, Department of Internal Medicine

**Dokuz Eylul University School of Medicine, Department of Internal Medicine,
35340 Inciraltı/Izmir**

aybukeh.olgund@gmail.com

OBJECTIVE: Hairy cell leukemia is a chronic lymphoproliferative disorder, presenting with spleen, bone marrow and liver infiltration which counts %2-3 percent of the leukemias. B-RAF – a commonly mutated protein kinase in cancers- is a member of mitogen activated protein kinase pathway, associated with cell proliferation. The most common B-RAF mutation V600E has been shown in hairy cell leukemia recently. The aim of our study is to investigate B-RAF^{V600E} and B-RAF codon 464-469 mutations in HCL patients and compare the results with clinical parameters.

METHOD: Thirteen individuals who were diagnosed and followed up with hairy cell leukemia in Dokuz Eylul University Faculty of Medicine Hematology outpatient clinic between the dates of January 2000 – December 2013 are included in our study. Demographic and clinical data are collected and B-RAF mutations are analyzed with pyrosequencing based molecular methods.

FINDINGS: B-RAF^{V600E} mutation was positive in 10 (%76,9) patients. B-RAF^{G464E} was mutated in one patient, B-RAF^{G466E} was positive in another and B-RAF^{G469E} mutation has been found in a patient. Two patients had both codon 600 and codon 464-469 mutations, showing no invincible difference clinically. All the patients having lymphadenopathy had B-RAF^{V600E} mutations.(p=1.000) Response rates were similar in the groups having B-RAF^{V600E} mutation and/or B-RAF codon 464-469 mutations.

RESULTS: B-RAF is a commonly mutated gene in hairy cell leukemia with different types of mutations. Especially B-RAF^{V600E} mutation can be used as a supportive diagnostic test, in cases with controversial diagnosis or differential diagnosis of other

peripheral B cell neoplasms. Also it can be used as a marker to select the candidate patients for target therapies, who did not respond to the conventional therapies.

KEY WORDS: Hairy cell leukemia, B-RAF^{V600E}, B-RAF^{G464E}, B-RAF^{G466E}, B-RAF^{G469E}

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Hairy cell lösemi (HCL), ilk defa 1958'de tanımlanan; özellikle kemik iliği ve dalak tutulumuyla seyreden B hücreli kronik lenfoproliferatif bir bozukluktur.¹ Erişkin lösemilerin %2'sini oluşturur ve erkeklerde 4-5 kat daha fazla görülür.²

Klinik olarak değişik oranlarda sitopeniler ve splenomegaliye bağlı şikayetlerle başvururlar. Sitopenilere bağlı halsizlik, yorgunluk, kanama, enfeksiyon gibi şikayetler; splenomegaliye bağlı sol üst kadranda ağrısı olabilir. Tanı periferik kan yayması, akım sitometrik bulgular, kemik iliği aspirasyon ve biyopsisinin incelenmesi ile konulur.³⁻⁶

Hairy cell lösemi tanısı kesinleştikten sonra, günümüzdeki tedavilere yüksek yanıt veren bir hastalıktır. Pürin analogları olan kladribin ve pentostatine yanıt oranları sırasıyla %100 ve %97'ye ulaşmaktadır. 20 yıla kadar hastalıksız sağkalım süreleri bildirilmiştir.⁷⁻¹⁷ Yüksek tedavi etkinliklerine rağmen pürin analogları ile tedavi yanıtı elde edilemeyen küçük bir hasta grubu bulunmaktadır. Bu hastalarda rituksimab gibi monoklonal antikorlar kullanılmakta ve yeni hedef tedavi stratejileri geliştirilmektedir.¹⁸

Yakın geçmişte HCL olgularında yüksek oranlarda B-RAF^{V600E} mutasyonu saptanmıştır.¹⁹ B-RAF(rapidly accelerated fibrosarcoma) bir protein-serin/treonin kinaz olup; büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlara cevap olarak hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasını düzenleyen MAPK(Mitojen aktive protein kinaz) yolağının bir üyesidir.²⁰⁻²² RAS ile aktive olan B-RAF; MEK aktivasyonuna neden olur. MEK tarafından aktiflenen ERK ise gen ekspresyonlarını ve metabolizmayı düzenler. Kanserlerin %30'unda MAPK sinyal yolağının hiperaktivasyonu gösterilmiştir. Bir MAPK sinyal yolağı bileşeni olan B-RAF malign melanom, kolorektal, akciğer, meme, over kanserleri, gliom ve sarkomlarda gösterilmiştir.^{23,24} En sık rastlanan B-RAF mutasyonu ekzon 15'te 1799. pozisyondaki timin nükleotidinin adeninin yerin geçmesi ile 600. lokalizasyondaki valin amino asitinin glutamata değişmesi sonucu oluşan B-RAF^{V600E}dir. Mutasyon sonucu artan B-RAF aktivitesi, MEK/ERK yolağının devamlı stimülasyonuna neden olur.^{21,25}

Günümüzde hairy cell lösemi olgularında yüksek oranda tanımlanan B-RAF^{V600E} mutasyonunun; tanısal amaçlı bir genetik test veya tedaviye yanıtı olmayan hastalarda bir tedavi hedefi olarak kullanılabilirliği tartışılmaktadır.

Çalışmamızda HCL hastalarında B-RAF^{V600E} mutasyonu ve B-RAF 464-469 kodonunda daha nadir görülen mutasyonların (B-RAF^{G464E}, B-RAF^{G466E}, B-RAF^{G469V}) sıklığı ve bu mutasyonların klinik veriler, tedavi yanıtları ve sağkalım ile ilişkisinin ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HAIRY CELL LÖSEMI

2.1.1. Tanım

Hairy cell lösemi (HCL); kemik iliği, dalak, karaciğer ve bazen de lenf bezi tutulumuyla seyreden B hücreli kronik lenfoproliferatif bir bozukluktur. Hastalık ayrıntılı bir şekilde ilk defa 1958’de Bouroncle ve ark. tarafından 26 hastada “Lösemik retiküloendotelyozis” olarak tanımlanmıştır.¹ 1966’da ise Schrek ve Donnelly kemik iliği ve kanda gözlemledikleri irregüler sitoplazmik çıkıntılı mononükleer hücreler nedeniyle hastalığı hairy cell lösemi olarak adlandırmışlardır.²⁶

2.1.2. Epidemiyoloji

Hairy cell lösemi erişkin lösemilerin %2’sini oluşturur. Batı dünyasında yılda yaklaşık 1200 yeni olguyla insidansı 3,3/1 milyon olarak saptanmıştır. Beyaz ırkta daha sık görülür. Irktan bağımsız olarak sıklığı erkeklerde kadınlara göre 4-5 kat fazladır.²

2.1.3. Klinik Bulgular

Kronik lösemiler arasında sıklıkla gözden kaçabilen bir hastalık olmasına rağmen, doğru tanı konulduğunda tedavi yanıtları oldukça başarılıdır. Bu nedenle hastalığın özelliklerini doğru anlamak ve kronik lenfoproliferatif hastalıkların ayırıcı tanısında hairy cell lösemi tanısını akla getirmek son derece önemlidir. Tipik olgu örneği pansitopeni, splenomegali ile prezente olan ve kemik iliği aspirasyonu “dry tap” düşündüren orta yaş erkek hastadır. Hastalar sıklıkla halsizlik ve çabuk yorulma (%46), splenomegaliye bağlı sol üst kadranda ağrısı (%15), sitopenilere bağlı kanama bulguları (%15), enfeksiyon (%15) ve infiltratif deri lezyonları (%12) ile başvururlar. Daha nadir olarak hastalar cilt, visseral organ, kemik, plevra ve BOS tutulumuyla başvurabilir. Nedeni bilinmemekle beraber HCL hastalarında primer sürece otoimmün bozukluklar ve ikincil maligniteler eşlik edebilir. Bazı olgular poliartrit, eritema nodozum, döküntü ve pulmoner infiltratlarla prezente olabilir. HCL seyrinden bağımsız olarak özellikle eklem ve deriyi tutan vaskülitik otoimmün bozukluklar geliştirebilir. Yine tanıdan önce veya sonra ve tedavi sonrası dönemde HCL

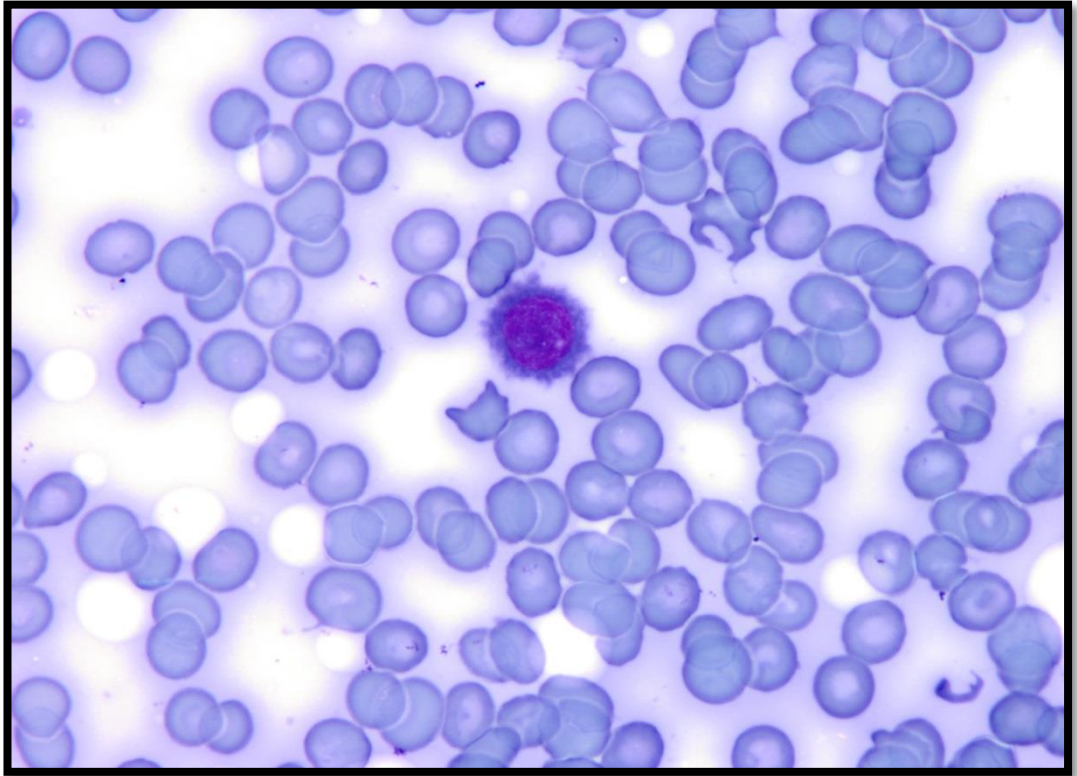
hastalarında non-Hodgkin lenfoma, plazma hücre diskrazileri, kronik myeloid lösemi, akut myeloid ve lenfoid lösemi gibi hematolojik maligniteler; prostat, tiroid, akciğer gibi solid organ kanserleri bildirilmiştir. Bununla birlikte HCL tanısının veya tedavisinin ikincil malignite riskini arttırdığına dair net bir kanıt yoktur³⁻⁶

Fizik muayenede splenomegali %80-96 oranında görülür ve hastaların yarısında dalak pelvik kemik üst kenarına uzanacak kadar büyüktür. Karaciğer olguların %58'inde kot kavsinde palpe edilir. Lenfadenopati daha az sıklıkla (%35) saptanır ve genellikle intraabdominaldir. Hastaların %50-70'inde pansitopeni görülürken, %30-50 değişik kombinasyon ve derecelerde anemi, lökopeni ve trombositopeni saptanabilir. Sitopeniler asemptomatik hastada rastlantısal bir bulgu da olabilir. Hastalarda anemi genellikle hipersplenizm ve/veya kemik iliği tutulumunun sonucudur. Kanın dalakta göllenmesi ve genişleyen plazma hacmi anemiye neden olur. Kemik iliğinin lösemik hücrelerle infiltrasyonu ve salgıladıkları sitokinlerle eritroid öncülleri suprese etmesi de bir diğer mekanizmadır. Nadir vakalarda hemolitik süreç de bildirilmiştir.^{27,28} Trombositopeni ekimoz, purpura, epiastaksis gibi deri ve mukozal kanamalarla kendini gösterebilir. Lökopeni, nötropeni ve monositopeni hastalarda immunsupresyon ve fırsatçı enfeksiyonlara neden olur. Özellikle monositopeni HCL'de dikkat çekici ve tanısaldır. Monositlerin selektif olarak supresyonunun mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber in vitro çalışmalarda lösemik hücrelerden salınan sitokinler, monosit koloni büyümesinin baskılanması ve azalmış monosit koloni stimulan faktör (MCSF) düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur.^{4,5} Hastaların %3-20'sinde monoklonal ve poliklonal gammopati saptanabilir ve genellikle eşlik eden plazma hücre diskrazileri, lenfoma veya otoimmün bozukluklara bağlı olabilir.

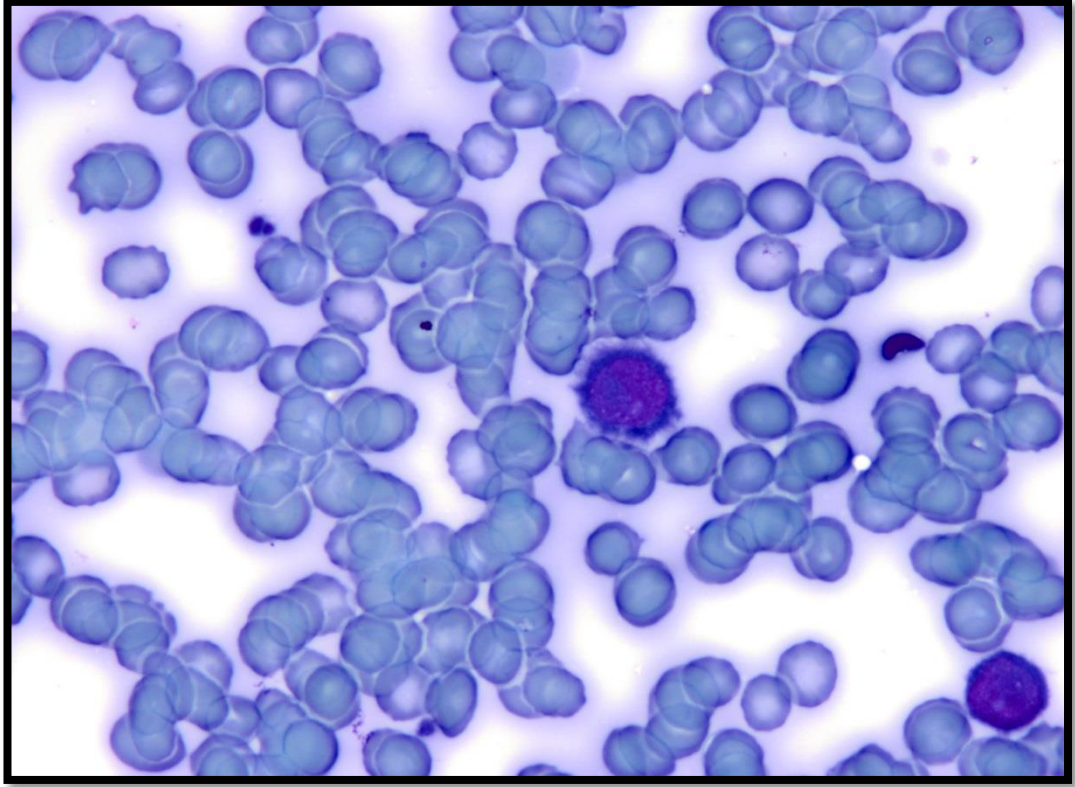
2.1.4. Tanı ve Histopatolojik Bulgular

Tanı klinik bulgularla beraber periferik kan yayması, akım sitometrik bulgular ve kemik iliğinin immunhistokimyasal incelemesi ile konur. Periferik kan yaymasında HCL hücresi olgun bir lenfositin yaklaşık 2 katı büyüklüğünde görülür. Hücre alanının büyük kısmını kaplayan değişebilen şekillerde bir nükleusu ve granüler göze çarpmayan bir nükleolusu bulunur. Sitoplazması Wright-Giemsa boylarıyla soluk mavi boyanır ve ultrastrüktürel olarak hastalığa hairy cell lösemi adını veren saçsı uzantılar içerir. Kemik iliği veya dalaktan hazırlanan histolojik örneklerde görülmeyen

bu villöz sitoplazmik uzantılar tipik olarak ribozom-lamella kompleksi olarak adlandırılan işlevi net bilinmeyen organeller içerir. Hairy cell lösemi hücreleri genel olarak değişik derecelerde tartarik asite dayanıklı izoenzim 5 tipinde asit fosfataz içerir. Patognomonik olmamakla beraber TRAP (tartarat rezistan asit fosfataz) ekspresyonu morfolojik özelliklerle birlikte değerlendirildiğinde neredeyse HCL'ye özgüdür. Buna rağmen TRAP boyası sadece havada kurutulmuş, periferik yayma ve kemik iliği aspirasyonu yayması gibi örneklerde kullanılabilir. Boyanma paterni sitoplazmik granülerite şeklinde olur. Kronik lenfositik lösemi (KLL), prolenfositik lösemi, erişkin T hücreli lenfoma/lösemide (ATCL) de TRAP pozitifliği bildirilmekle beraber, bu hücreler morfolojik olarak HCL hücrelerinden belirgin şekilde farklıdır. Ciddi lökopenisi olan hastalarda HCL hücrelerinin periferik yaymada görülemediği durumlarda periferik kandan buffy coat örnek hazırlanması lösemik hücrenin varlığını göstermede faydalı olabilir. Bu koşullarda kemik iliği incelemesinin genelde yoğun bir şekilde tipik HCL hücreleri ile infiltrate olduğu görülür. ²⁹⁻³¹

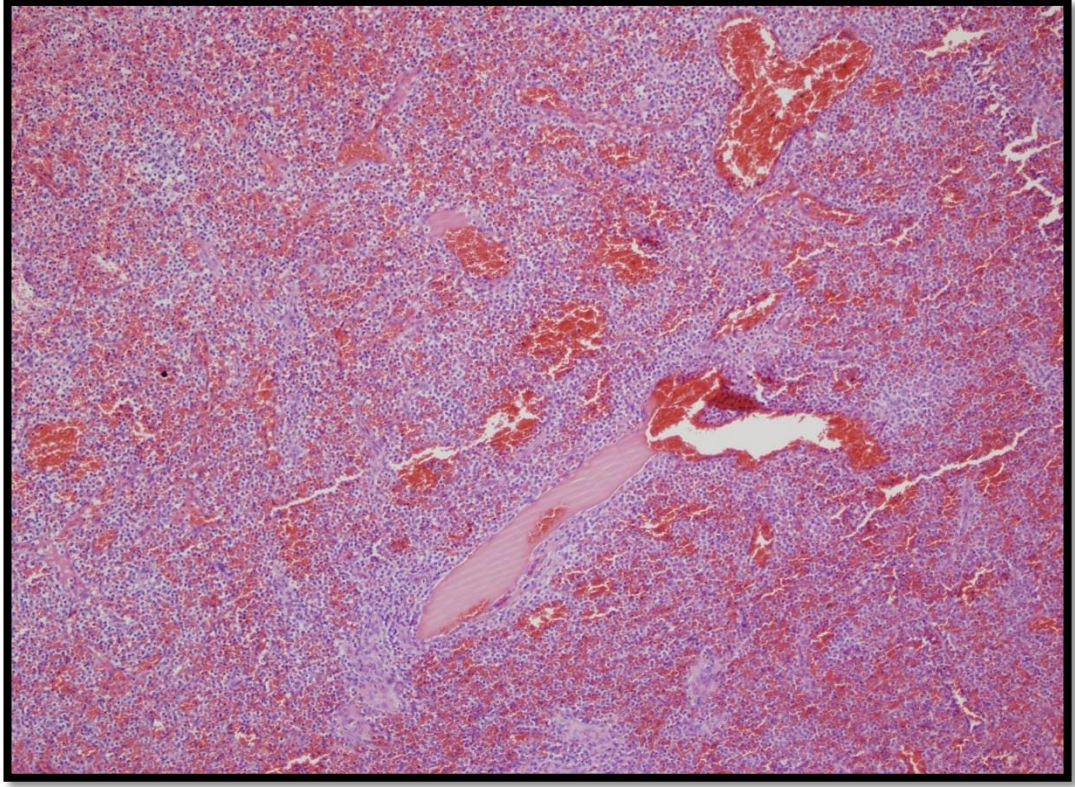


Resim-1: Kemik iliği aspirasyon yaymasında HCL hücresi. Sitoplazmik saçsı uzantılar. (Wright boyama, X100 büyütme)

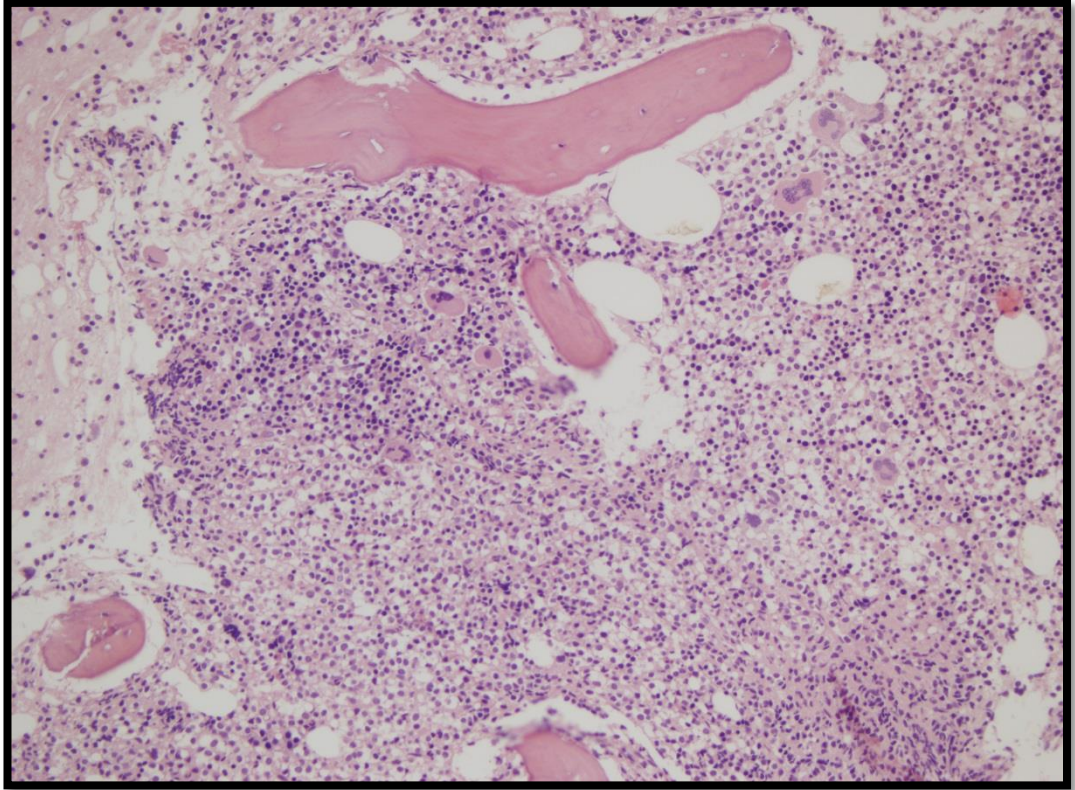


Resim-2: Kemik iliği aspirasyon yaymasında iki adet HCL hücresi. Sitoplazmayı büyük oranda kaplayan nukleus, belirgin olmayan nukleolus ve saçsı uzantılar. (Wright boyama, X100 büyütme)

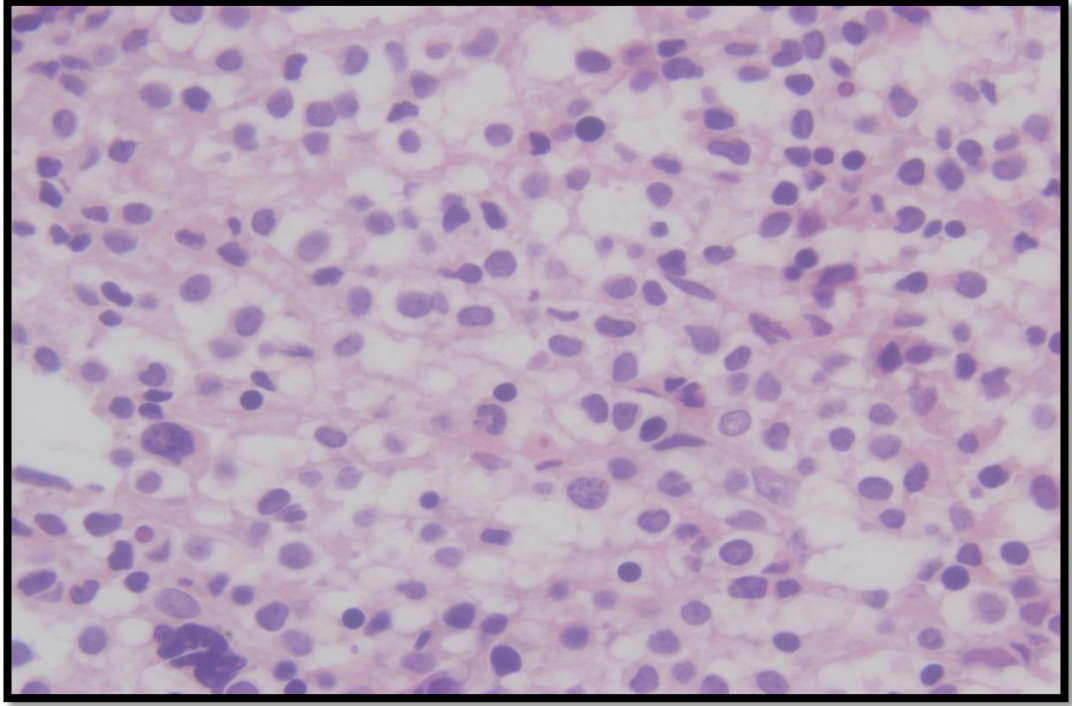
Kemik iliği tutulum paterni fibrozise bağlı hiposellülerden, lösemik hücrelerin geniş tabakalar halinde kemik iliği elenmanlarının yerine geçerek hipersellüler hale gelmesi şeklinde değişebilir. En sık olarak ilik yağ dokusunu koruyan interstisyel infiltratlar halinde görülür. Ayrıntılı bakıldığında HCL hücresinin sitoplazmik kenarını çevreleyen halo “pişmiş yumurta” görünümü verir. Lösemik hücreler ilikteki mikrodamar yapısını bozarak, eritrosit ekstravazasyonuna bağlı psödosinus görünümü oluşturabilir. Fibronektin üretimi sonucu perisellüler fibronektin depozitleri kemik iliği fibrozisine neden olabilir. Dalak kırmızı pulpa hemorajilerine bağlı makroskopik olarak büyümüştür. Sinüzoidal hücrelerin kaybı ve HCL hücrelerinin kırmızı pulpayı yoğun şekilde infiltre ederek oluşturduğu psödosinüsler, dalak kordlarının ve sinüslerinin yapısal bütünlüğünü bozar. KLL’den farklı olarak beyaz pulpa alanları atrofik hale gelir. Lenf nodu tutulumu interfolliküler veya parakortikal yayılım şeklinde olur, adipöz dokuya kadar genişleyebilir.²⁹⁻³¹



Resim-3:Hairy cell lösemi, dalak kırmızı pulpa hemorajileri (H&E boyama, X10 büyütme)



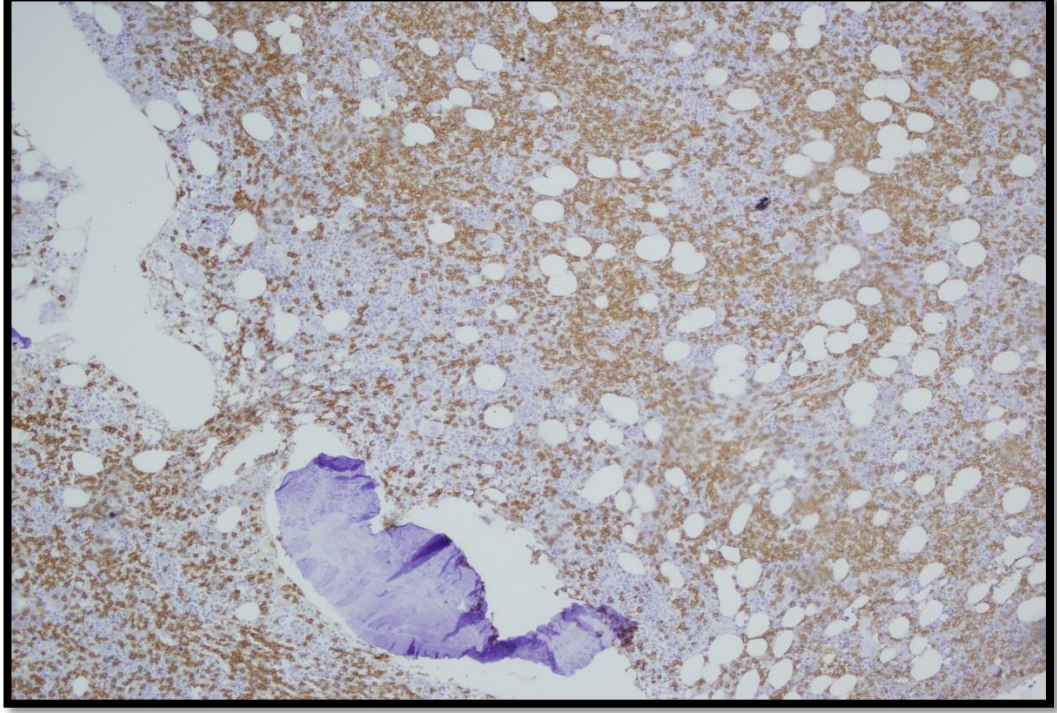
Resim-4: Hairy cell lösemi diffüz kemik iliği infiltrasyonu (H&E boyama, X20 büyütme)



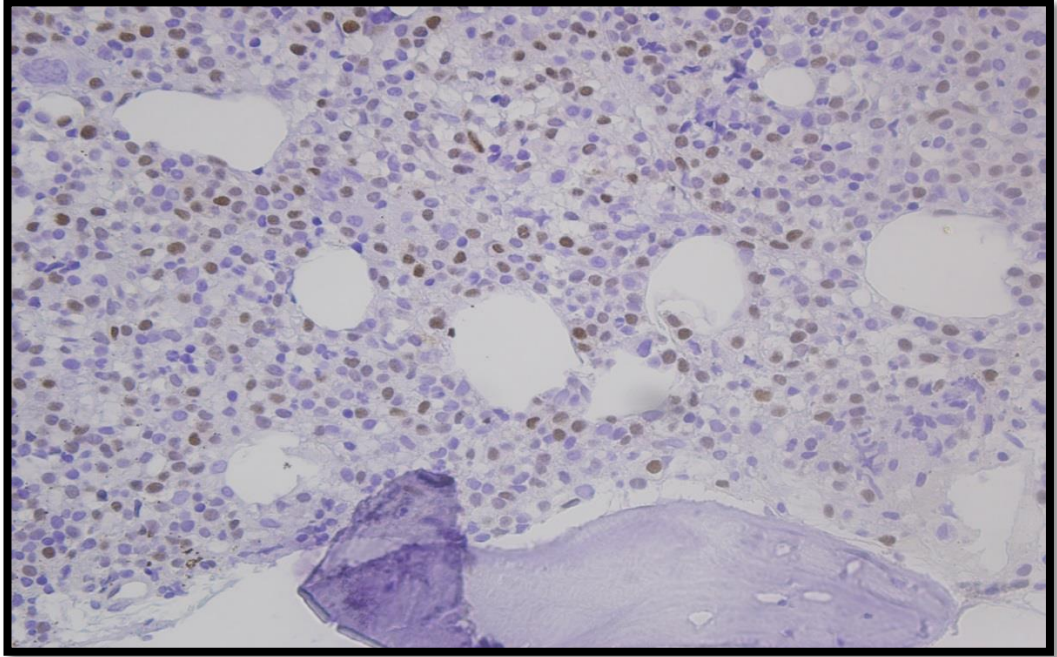
Resim-5: Hairy cell lösemi hücreleri, kemik iliğinde “pişmiş yumurta görünümü” (H&E boyama, X100 büyütme)

İmmunhistokimyasal incelemede HCL hücreleri CD20, DBA.44, 9C5, anneksin A1, CD11c, CD25, CD103 ile güçlü, siklin D1 ile zayıf ve fokal boyanma gösterirler. Tipik olarak CD5, CD23 ve CD10 ile boyanma olmaz. B hücre monoklonal antikorları DBA.44 ve TRAP antikorları 9C5 HCL’de %90-95 pozitiflik gösterir. Anneksin A1 ile boyanma myeloid hücreler ve belli oranda T hücrelerinde de görülebildiği için her zaman bir B hücre antijeniyle birlikte değerlendirilmelidir. Anneksin A1 özellikle HCL’nin ayırıcı tanısında splenik marjinal zon lenfoma (SMZL) ve Hairy cell lösemi varyant tip (HCL-V) dışlanmasında diğer B hücreli lenfomalarda bulunmadığı için yüksek spesifiteye sahiptir. CD11c, CD25 ve CD103 monoklonal antikorları ile boyanma yine HCL’ye spesifitesi yüksek bir özelliktir. CD11c granülosit, monosit, NK(natürel killer) hücreler ve bazı T ve B lenfositlerde eksprese edilir. Aynı zamanda KLL/SLL(Küçük lenfositik lenfoma) ve SMZL gibi lenfoproliferatif bozukluklarda da ekspresyonu mevcuttur. HCL’de CD11c ekspresyonu değişmez bir şekilde bulunur ve KLL/SLL ve SMZL’ya göre yaklaşık 30 kat fazladır. IL-2 reseptörü CD25 HCL’de %90’ın üzerinde eksprese edilir. Yine KLL’lerin yarısında ve bazı diğer B hücreli lenfoproliferatif bozukluklarda da pozitiflik saptanmasına rağmen HCL’deki boyanma CD11c kadar olmasa da dikkat çekici derecede fazladır. Önceleri bir intraepitelyal T

hücre belirteci olarak tanımlanan CD103 HCL olgularının %95'inde bulunur. SMZL'ların küçük bir kısmı dışında B hücreli lenfoproliferatif bozukluklarda CD103 ekspresyonu nadir görüldüğü için HCL için en spesifik immun belirteçtir. Yüzey immunglobulini genellikle yüksek oranda pozitifdir.^{30,31}



Resim-6: Hairy cell lösemi, kemik iliği infiltrasyonu (CD20 boyası, X20 büyütme)



Resim-7: Hairy cell lösemi kemik iliği infiltrasyonu (Siklin D1 boyası, X40 büyütme)

Periferik kan veya kemik iliği aspirasyonundan akım sitometrik inceleme de tanıda son derece yararlıdır. CD19, CD20 ve CD22 gibi B hücre belirteçleri ve yüksek miktarda yüzey immunglobulini hemen her zaman pozitifdir. CD5 ve CD23 negatiftir. Akım sitometrik incelemede; tipik HCL fenotipi dikkat çekici miktarda yüzey immunglobulini, CD20, CD22, CD11c eşzamanlı ekspresyonu ile CD25, CD103 pozitifliğidir. Akım sitometri için önerilen HCL paneli CD11c, CD25, CD103 ve CD123'ü içerir. Bu belirteçlerin üç veya dördünün pozitif olması HCL ile diğer periferik B hücre neoplazilerinin ayrımını sağlar.³²

	CD5	SiklinD1	CD23	CD25	TRAP	AnnexinA1	CD103	CD11c
HCL	-	+	-	+	+	+	+	+
Splenik Kırmızı Pulpa Lenfoması	-	-	-	-	-	-	-	+/-
HCL Varyant Tip (HCL-V)	-	-	-	-	+/-	-	+	+
KLL/SLL	+	-	+	-	-	-	-	+/-
SMZL	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo-1: Splenomegali ve kemik iliği tutulumuyla seyreden küçük B hücreli lenfoproliferatif bozuklukların immunhistokimyasal profilleri

2.1.5. Ayırıcı Tanı

Hairy cell lösemi tanı konulduğu takdirde tedavi başarısı yüksek olduğu için doğru tanı yaşamsal öneme sahiptir. Ayırıcı tanıda splenomegali, kemik iliği tutulumu ve periferik kanda değişik derecelerde lenfositoz ile seyredebilen hematolojik maligniteler dışlanmalı, yine kemik iliği fibrozisi ile sonuçlanan hematolojik bozuklukların ayrımı yapılmalıdır.³³

- HCL Varyant Tip
- Villöz Lenfositlerle birlikte olan Splenik Lenfoma (SLVL)
- Kronik Lenfositik Lösemi/Küçük Lenfositik Lenfoma
- Splenik Marjinal Zon Lenfoma
- Splenik Diffüz Kırmızı Pulpa Lenfoması
- İdiopatik Myelofibrozis

Tablo-2: Hairy cell lösemi ayırıcı tanısı

2.1.6. Hairy Cell Lösemi Varyant Tip (HCL-V)

HCL olgularının %10'u klasik hastalık tanımından farklı laboratuvar, morfolojik özellikleri ve farklı davranışları nedeniyle HCL-V tip olarak sınıflandırılmaktadır. Bugüne kadar 4 varyant tip tanımlanmış olup, bunlar blastik tip, prolenfositik tip, multilobular tip ve HCL-KLL hibrid tipidir. HCL-V hastaları daha yaşlıdır, erkek egemenliği olup HCL'ye kıyasla oran daha azdır. Splenomegali daha az görülür. Karakteristik olarak lökopeni ve monositopeni saptanan HCL'nin aksine HCL-V genellikle lökositoz ve lenfositoz ile prezente olur. Histolojik olarak hücreler prolenfosite benzer. Nukleolus göze çarpar şekilde belirgindir. Kemik iliği sıklıkla ılımlı fibrozisle birlikte hipersellülerdir, kuru ilik nadirdir. Eşlik eden otoimmün bozukluklar daha nadirdir. Hastaların kliniği daha agresif seyreder, kötü tedavi yanıtları ve kötü prognoz ile ilişkilidir.^{3,34,35}

KLASİK HCL	HCL VARYANT TİP
Orta yaş	Yaşlı
Sitopeniler, monositopeni	Lökositoz, monositopeni yok
Splenomegali çok sık	Splenomegali daha az
Kuru ilik, myelofibrozis sık	Hipersellüler kemik iliği, ılımlı mtelofibrozis
Oval nukleuslu, geniş sitoplazmalı, saçsı uzantıları olan küçük B-lenfoid hücreler	Prolenfosite benzer hücreler
Otoimmün bozukluklar sık	Otoimmün bozukluklar daha nadir
Standart tedaviye iyi yanıt	Tedavi yanıtı ve prognoz kötü

Tablo-3. HCL ve HCL varyant tip ayrımı

2.1.7. Tedavi

Hairy cell lösemi sıklıkla yavaş seyirli bir hastalık olmasına rağmen ilk tanımlandığında hastaların median sağkalımı 4 yıldır. 1980'li yıllarda nükleozid analoglarının HCL standart tedavisine girmesiyle hastalığın prognozu hızla değişti.^{1,36}

Günümüzde etkin tedavi seçeneklerine rağmen hastalığın yavaş seyri nedeniyle asemptomatik hastalarda tedavisiz yakın izlem yapılabileceği önerilmektedir.^{32,37,38} Golomb ve ark.ları absolut nötrofil sayısı $\geq 1000/\mu\text{L}$ (ANS) olan, dalağı palpe edilmeyen veya kot kavsinde minimal ele gelen yaşlı hastalarda tedavisiz izlem yapılabileceğini öne sürmüşlerdir. Yine kemik iliğinde minimal interstisyel infiltrasyon olan, dalağı küçük olan veya ele gelmeyen; $\text{ANS} \geq 1000/\mu\text{L}$, Hb(Hemoglobin) değeri $> 12\text{gr/dL}$ ve trombosit sayısı $> 100000/\mu\text{L}$ olan hastaların da başlangıç aşamasında tedavisiz izlem adayı olabileceği belirtilmiştir.³⁹ Goodman ve ark.ları ise ciddi sitopenisi olmayan ($\text{ANS} \geq 1000/\mu\text{L}$, Hb değeri $> 10\text{gr/dL}$ ve trombosit sayısı $> 100000/\mu\text{L}$ olan) asemptomatik hastalar için tedavisiz izlemin uygun bir seçenek olduğunu, erken tedavinin yanıt veya yaşam oranlarını değiştirmedeğini öne sürmüştür. Hematolojik parametrelerin bu değerlerin altında olduğu ciddi nötropeni, anemi, trombositopeni; semptomatik splenomegali, HCL'ye bağlı ateş yüksekliği ve gece terlemesi gibi konstitüsyonel semptomlar, rekürren ciddi enfeksiyonlar varlığında tedavi önerilmiştir. Diğer tedavi endikasyonları arasında ise lökositoz ($\text{WBC} > 20000/\mu\text{L}$), bulky veya hassas lenfadenopati, vaskülit ve kemik tutulumları bulunmaktadır.^{38,40}

Tedavi endikasyonu olan hastalarda nükleozid analogları öncesi splenektomi ve interferon α (IFN α) en efektif tedavi seçenekleriydi. Özellikle 1980'lerde rekombinant IFN α 'nın HCL'de kullanıma girmesinden önce splenektomi ilk basamak tedavi olarak yapılmaktaydı. Tanı anında hastaların yaklaşık %90'ında splenomegali olması bu tedavi seçeneğinin dayanağını oluşturmaktaydı ancak yapılmış herhangi bir randomize kontrollü çalışma yoktu. Splenektomi kemik iliği infiltrasyonuna etki etmezken, özellikle lösemik hücrelerin infiltre ettiği dalağı hedefleyerek; semptomatik splenomegali ve splenomegaliye bağlı sitopenileri iyileştirmekteydi.⁴¹ Literatür incelendiğinde splenektomi ile yanıt oranlarının %60-100 arasında değiştiği

görülmektedir. Ancak bu sonuçlar geçmişteki yanıt kriterleriyle tam ve parsiyel yanıt olarak kabul edilirken günümüzde ancak minör yanıt kriterlerini karşılamaktadır. Ayrıca splenektomiyle elde edilen yanıtların geçici olduğu, hastaların bir süre sonra progresif sitopeni geliştirdiği görülmüştür. Bu yüzden tek başına splenektominin sağkalıma olumlu etkisinin kesin bir kanıtı yoktur. Daha etkin tedavi yöntemlerinin gelişmiş olması nedeniyle bu konuda gelecekte randomize kontrollü bir çalışma yapılması da beklenmemektedir.⁴²⁻⁴⁴ Sonuç olarak splenektomi günümüzde standart tedavideki yerini kaybetmiş ancak sınırlı endikasyonlarla yapılır hale gelmiştir. Bu endikasyonlar arasında tanısal amaçlı splenektomi, relaps veya refrakter hastalık, masif hassas splenomegali, dalak rüptürü sayılabilir.^{37,38,45,46} Özellikle hastalığın kadınlarda ve genç yaşlarda nadir görülmesi, gebelikte standart bir tedavi yaklaşımının sağlanamamasına neden olmuştur. Semptomatik HCL tanılı gebe hastalarda özellikle laparoskopik splenektominin uygun bir tedavi seçeneği olabileceği belirtilmiştir.^{45,47}

Interferon- α HCL’de yanıt elde edilen ve FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanan ilk biyolojik ajandır. HCL hastalarında kullanımıyla ilgili ilk sonuçlar 1984’te Quaseda ve ark.ları tarafından bildirilmiştir. Yedi hasta 3mIU pürifiye lökosit IFN α ile tedavi edilmiş 3 hastada tam yanıt(TY) dört hastada kısmi yanıt (KY) elde edilmiş, yanıtlar 6-10 ay devam etmiştir.^{41,48} Doğal IFN α , rekombinant IFN β (Interferon beta) ve rekombinant IFN γ (Interferon gama) da tedavide denenmiş ancak IFN β ve IFN γ ile etkin sonuçlar elde edilememiştir. 1986’da FDA onaylı 2 rekombinant IFN α preparatı: IFN α -2a ve IFN α -2b geliştirilmiştir. 1986’da yine Quaseda ve ark.ları tarafından daha önce tedavi almış veya almamış otuz hastaya 4-6 ay boyunca 3 mIU/gün rekombinant IFN α -2a ile subkutan (s.c.) veya intramuskuler (i.m.) olarak verilmiş, haftada üç kez devam edilerek bir yıla tamamlanmıştır. IFN α ’nın sitopenilerde düzelme, dalak boyutunda küçülme, kemik iliği infiltrasyonunda azalma yaptığı gösterilmiş. Hastaların tedavi yanıtları o yıllarda NCI’in (National Cancer Institute) desteklediği güncel yanıt kriterleriyle değerlendirilmiş; %30 TY, %57 KY ve %13 minör hematolojik yanıt elde edilmiştir.⁴⁹ Takip eden yıllarda IFN α ile yapılan çalışmalarda %62 ile %73 arasında KY elde edilmiştir.⁵⁰⁻⁵² Yanıtlar çoğunlukla kısmi yanıt şeklinde olup IFN α -2a ile IFN α -2b arasında belirgin fark gösterilmemiştir. IFN α ’nın etki mekanizması HCL’de halen

aydınlatılmamıştır. Lösemik hücrelerde IFN α reseptörleri mevcut olup, IFN α bu hücrelerde sitostatik fonksiyon göstermektedir. Bu etkinin IFN α 'nın hematopoetik büyüme faktörlerini baskılamasına ve HCL hücrelerini büyüme sinyallerine karşı daha az duyarlı bir duruma getirerek hücre çoğalmasını azaltmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.⁴¹ IFN α tedavisine yanıt ilk haftada periferik kandaki lösemik hücrelerin azalması, 2 ay içinde trombositlerin, 4 ay içinde Hb değerinin, 5 ay içinde lökositlerin yükselmesi şeklinde olmaktadır. Ancak hastaların çoğunda rezidüel lösemik hücreler ve kemik iliği fibrozisi sebat etmektedir. Bu konuda farklı doz veya tedavi şemalarının herhangi bir olumlu etkisi gösterilmemiştir. IFN α -2b için önerilen tedavi 12 ay boyunca haftada üç kez 2mIU/m² dozda s.c; IFN α -2a için ise 6 ay boyunca günde 3mIU/m² s.c. daha sonraki altı ay haftada üç kez aynı dozda s.c. devamı şeklindedir.³⁸ HCL tedavisinde kullanılan IFN α dozları genellikle iyi tolere edilmekle beraber bazı yan etkileri mevcuttur. En sık görülen yan etki halsizliktir. Ateş yüksekliği, grip benzeri semptomlara 1-4 hafta içinde taşiflaksi gelişmekte, bu şikayetler non-steroid antiinflamatuar ilaçlara yanıt vermektedir. İştahsızlık, bulantı, kusma, ishal görülebilir. Depresyon, periferik nöropati, uykuya eğilim, konfüzyon, mental statüs değişiklikleri gibi nöropsikiyatrik yan etkiler standart HCL tedavi dozlarında oluşabilir. Aritmiler, hipotansiyon, girişim yerinde lokal doku reaksiyonları, küçük eklem artrit, hepatotsteatoz ve hepatit, alopesi, libido kaybı diğer görülen yan etkilerdir. Pürin analoglarının HCL tedavisine girmesiyle yanıt oranları artmış ve IFN α ilk basamaktaki yerini kaybetmiştir, ancak halen bazı hastalarda kullanımı söz konusudur. Özellikle gebelerde kullanımı ve derin nötropenisi olan hastalarda pürin analogları öncesi kullanımı önerilmektedir. Yine pürin analogları sonrası relaps veya refrakter olan hastalarda da IFN α bir tedavi seçeneği olarak denenebilir.^{37,46}

Pürin analogları 1984'te Spiers ve ark.larının pentostatin (2-deoksikoformisin =DCF) ile tedavi edilmiş iki hastadan elde ettikleri tam yanıt sonuçları sonrası HCL tedavisine girmiştir. Hiç tedavi almamış iki erkek hasta intermittan olarak düşük doz pentostatin ile tedavi edilmiş; sonuçta lösemik hücrelerin periferik kandan temizlendiği, splenomegali ve lenfadenopatinin gerilediği, pansitopenilerin düzeldiği görülmüş, kemik iliği aspirasyon ve biyopsisi ve radyolojik yöntemlerle kanıtlanmış tam yanıt bildirilmiştir.⁵³ Kraut ve ark.ları daha geniş hasta gruplarında pentostatin ile yüksek oranda elde ettikleri tam yanıt oranlarıyla bu sonucu doğrulamıştır.^{54,55}

Pentostatin; adenozin ve deoksiadenozini inozin nükleotid türevlerine çeviren adenozin deaminazın (ADA) irreversibl inhibitörüdür. ADA inhibisyonu sonucunda lösemik hücrelerde deoksiadenozin ve deoksiadenozin trifosfat birikimine bağlı pürin metabolizmasında ve DNA sentezinde azalma meydana gelir. DNA kırılmaları, DNA onarımının bozulması, RNA transkripsiyon inhibisyonuna bağlı hücre ölümü pentostatinin etki mekanizmasında önemli rol oynar.^{37,56}

Pentostatin ile yapılan uzun dönem çalışmalarda; toplam yanıt oranları %84-%97 arasında bildirilmiştir. Hastalarda TY oranları %42,4-%81 arasında iken kısmi yanıt oranları %42,4-%82 olarak saptanmıştır.⁷⁻¹² 5 yıllık ve 10 yıllık hastalıksız sağkalım oranları sırasıyla %77-88,1 ve %67-68,8 olarak, median hastalıksız sağkalım süresi 15 yıl, 10 yıllık toplam sağkalım %88,7-%96, özellikle tam yanıt elde edilen hastalarda toplam sağkalım süresi 20 yıl ve üzeri olarak bildirilmiştir.^{12,14,57,58} Pentostatinin tedavi şeması haftada bir veya iki haftada bir 2-4mg/m²/gün intravenöz (i.v.) infüzyon şeklindedir.^{10,11,59,60} Toksik yan etkiler görülmedikçe tam yanıt elde edilene veya tedavi yanıtı olmadığına kadar kürlerin devam etmesi önerilmektedir. Tipik olarak 8-9 kür sonra hematolojik parametrelerin düzelmesi beklenir. Bu noktada kemik iliği biyopsisi yapılarak yanıt değerlendirilmesi; TY elde edilmişse ek olarak 1-2 kür daha pentostatin verilmesi önerilmektedir.^{13,57} Sıklıkla görülen yan etkiler myelosupresyon, bulantı, kusma, deri döküntüleri, kaşıntı, fotosensitivite ve atriyoventriküler blok, anjina pectoris, aritmiler gibi kardiyotoksik etkilere sahiptir. Her ilaç uygulamasında 1,5 litre i.v. sıvı hidrasyon yapılmalıdır. Kreatinin klirensi > 60ml/dk olanlarda doz ayarlaması önerilmezken; düşük klirens, performansı kötü ve kemik iliği hiposellüler olan hastalarda doz ayarlaması önerilmektedir. Hastalar tedavi süresince ve sonrasında enfeksiyonlar açısından yakın takip edilmelidir. Herpes enfeksiyonları ve Pneumocystis jirovecii enfeksiyonları açısından mutlak lenfosit sayısı >1000/μL olana kadar asiklovir ve ko-trimoksazol profilaksisi yapılmalıdır. Transfüzyon ilişkili graft versus host hastalığı ihtimalini azaltmak için pentostatin tedavisi alan hastalara ömürboyu ışınlanmış kan ürünleri verilmelidir.^{32,45,60,61}

Kladribin ilk olarak Piro ve ark.ları tarafından HCL tedavisinde kullanılmış, %90 üzerinde tam yanıt elde edilmiştir.⁶² Kladribin (2-deoksikloroadenozin) bir ön-ilaç olup intrasellüler olarak deoksisitidin kinaz (dCK) tarafından kladribin-trifosfata çevrilir.

Özellikle dCK'dan zengin lenfosit ve monosit gibi hücrelerde etkisi daha yüksektir. Aktif form olan kladribin-trifosfat DNA'ya eklenerek, DNA uzamasını engeller; onarım mekanizmalarıyla yarışarak onarılamayan DNA kırılmalarına yol açar. DNA polimeraz- β inhibisyonu ile DNA sentezini engeller; S-adenilhomosistein hidrolaz inhibisyonu ile DNA metilasyonunda azalmaya yol açar. Bax (Bcl-2 associated X protein) ekspresyonu ve mitokondriyal yolaklar ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) aracılığıyla apoptozu indükler.^{37,40,45}

Kladribin HCL'de etkinliğini kanıtlamış bir ajandır. Toplam yanıt oranları %100'e ulaşmaktadır.¹²⁻¹⁷ Dearden ve ark.ları birinci, ikinci ve üçüncü sıra tedavide dahi kladribin ile %100 toplam yanıt oranları elde edildiğini göstermiştir. Aynı çalışmada ilk sıra tedavide tam yanıt oranı %76 olarak bildirilmiştir.¹⁴ Goodman ve ark.ları 7 gün boyunca 0,1mg/kg/gün devamlı i.v. ile kladribin tedavisi ile %95 tam yanıt elde etmişlerdir.¹⁷ Almanya'da yapılan bir çalışmada yine 0,1mg/kg/gün devamlı i.v. infüzyon şeklinde kladribin alan 44 hastadan 43'ü(%98) tam yanıt göstermiş, bir hastada ise parsiyel yanıt görülmüştür.¹⁵ Saven ve ark.ları geniş hasta gruplarında kladribin ile tam yanıt oranını %91 olarak saptanmışlardır.¹⁶ Hastalara 24 saat i.v. devamlı kladribin infüzyonu ile 2 saat aralıklı i.v. kladribin infüzyonu veya 5 gün ile 7 günlük şemada verilmesi karşılaştırıldığında, veriliş şekillerine göre yanıt oranlarında veya yan etkilerde belirgin fark görülmemiş; enfeksiyon sıklığı 5 günlük şemada daha az saptanmıştır.⁶³ Von Rohr ve ark.ları kladribini 5 gün boyunca 0,14mg/kg/m² dozda günde bir kez s.c. olarak tek kür şeklinde vermiş, %97 oranında toplam yanıt; %76 TY, %21 KY elde etmişlerdir.⁶⁴ 20 yıllık toplam sağkalım hiç tedavi almamış hastalarda %80 iken, farklı tedaviler sonrası kladribin alan hastalarda %40'lardadır.⁶⁵ Else ve ark.ları HCL hastalarında kladribin sonrası 10 yıllık toplam sağkalımı %100 oranında bildirmiştir.¹² Değişik serilerde toplam sağkalım oranları %79-98 arasında değişmektedir.¹⁵⁻¹⁷

Kladribinin sık yan etkileri myelosupresyon, deri döküntüleri, bulantı, kusma ve ishaldir. Daha nadir olarak doz ilişkili nefrotoksisite ve nörotoksisite görülebilir. Özellikle T lenfositlerin baskılanmasına bağlı fırsatçı enfeksiyonlar görülebilir. Bu nedenle pentostatin gibi herpes ve pneumocystis enfeksiyonları açısından mutlak lenfosit sayısı >1000/ μ L olana kadar ko-trimoksazol ve asiklovir profilaksisi

verilmelidir. Kladribin tedavisi alanlarda da kan ürünleri ömürboyu ışınlanmış olarak verilmelidir.^{32,45,61} Kladribin veya pentostatin alan hastaların uzun dönem izlemlerinde iki ajan arasında kaçınıcı sıra tedavide verildiğinden bağımsız olarak tedavi yanıtları, yan etki profilleri ve sağkalım açısından anlamlı fark görülmemiştir.¹²⁻¹⁴ Relaps olan hastaların büyük kısmında pürin analogları ile tekrar remisyon elde edilmektedir. İkinci sıra tedavide pürin analogu seçimi, ilk remisyonun süresine bağlı seçilebilir. Örneğin iki yılın üzerinde remisyonu olanlarda aynı ajan ile tekrar tedavi, iki yıldan önce relaps olanlarda ise pürin analogu değişimi düşünülebilir. Else ve ark.ları tam yanıt süresinin birinci, ikinci veya üçüncü sıra tedavide farklılık göstermediğini saptamıştır. Bununla birlikte her seferde tam yanıt oranlarının azaldığı gösterilmiştir.^{13,66} Bu nedenle relaps olan hastalarda pürin analoglarının rituksimab ile kombinasyonu önerilmektedir.

Rituksimab; kalsiyum kanal işlevi olan, non-glikozile transmembran proteini CD20'nin monoklonal antikorudur. HCL hücrelerinde yüksek oranda CD20 ekspresyonu olması rituksimabın bu hastalıkta kullanımını gündeme getirmiştir. İlk sıra tedavide rituksimaba tam yanıt oranı %10-60 oranındayken; relaps veya refrakter HCL'de özellikle pürin analogları ile kombinasyonda %89 tam yanıtla beraber toplam yanıt oranları%100'e kadar çıkmaktadır.⁶⁷⁻⁶⁹ Bu nedenle günümüzde relaps veya refrakter HCL'de pürin analoglarına rituksimab eklenmesi önerilmektedir.³²

2.2. B-RAF

2.2.1. Tanım

Protein kinazlar hücre biyolojisinin her aşamasında görev alır. Protein kinaz ailesi 518 gene sahip en geniş gen ailelerinden birisidir. Protein kinazlar; proteinlerin -OH gruplarını fosforile ederek fonksiyonlarını yerini getirir. Fosforile -OH grubuna göre protein-serin/treonin kinazlar (385 tip), protein-tirozin kinazlar (90 tip), ve tirozin-kinaz benzeri proteinler (43 tip) olarak sınıflandırılmaktadır. Hem tirozin hem treonin fosforilasyonu yapan MEK1 ve MEK2 gibi küçük bir grup dual etkili kinazlar, protein-serin/treonin kinaz ailesi altında sınıflandırılmaktadır. A-RAF, B-RAF ve C-RAF, retroviral onkojenlerle ilişkili 3 üyeli bir protein-serin/treonin kinaz ailesidir. RAF-1

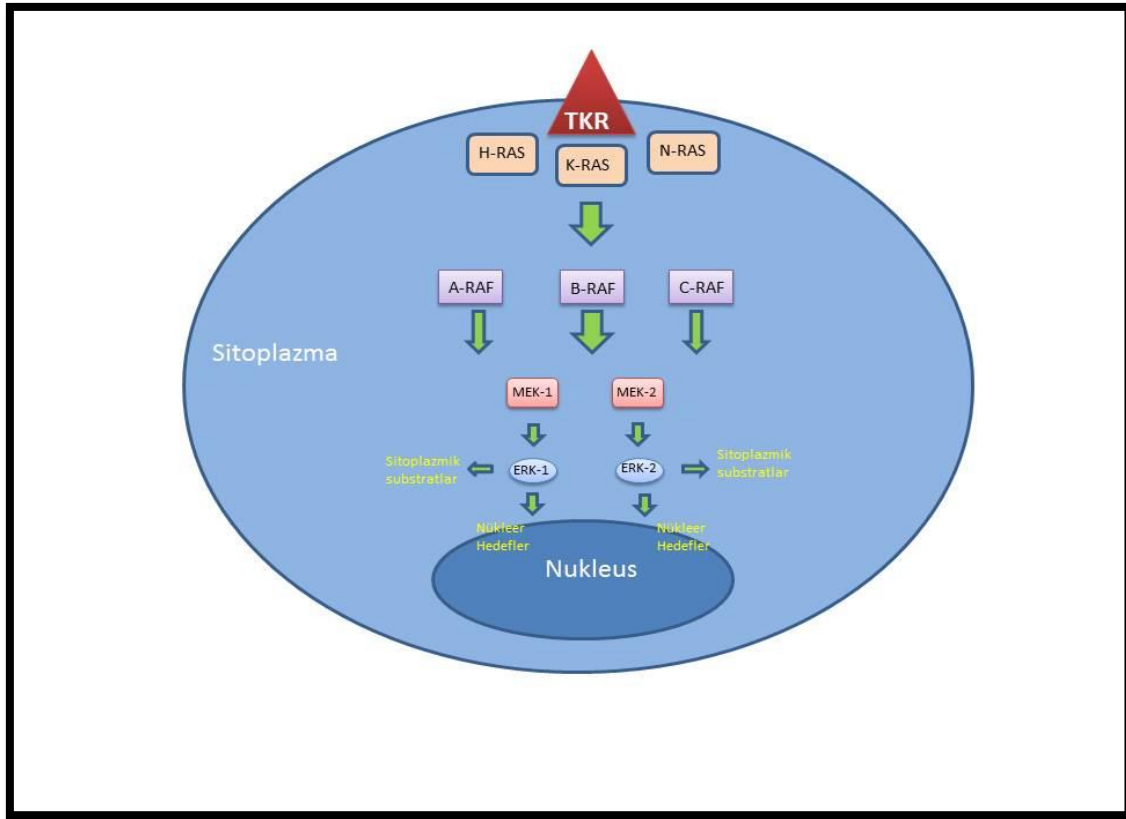
(rapidly accelerated fibrosarcoma) 1985'te keşfedilmiştir ve günümüzde C-RAF olarak adlandırılmaktadır. A-RAF 1986'da, B-RAF 1988'de tanımlanmıştır. B-RAF diğer izoformlara göre daha potent bir atkivatördür.^{21,70}

2.2.2. RAF-MEK-ERK Yolağı

RAF-MEK (MAP/ERK kinaz)-ERK (ekstrasellüler sinyal-regüle kinaz) transdüksiyon yolağı diğer adıyla MAPK(Mitojen aktive protein kinaz) yolağı, RAS ile aktive edilen bir protein kinaz kaskadıdır. Bu yolak büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlara cevap olarak hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasını düzenler. Büyüme faktörleri, sitokinler veya hormonlarla aktive olan RAS (rat sarkoma virüsten gelmektedir) membrana sitoplazmik yüzden bağlı küçük bir G proteindir. GTPaz aktivitesi olan RAS'ın guanozin trifosfat (GTP) ile kompleksi, kinazın N terminalindeki RAS bağlayan alan (RBD) ile etkileşerek RAF aktivasyonunu başlatır. Ardışık yapısal değişiklikler RAF fosforilasyonu ve serin/treonin kinaz aktivitesinin stimülasyonuna yol açar ve MEK 1/2 aktivasyonu ile sonuçlanır. MEK1/2 ise tek substratı olan ERK1/2'yi aktive eder. ERK; ekstrasellüler sinyalleri ve farklılaşma, çoğalma, yaşlanmayı kontrol eden gen ekspresyonlarını, sitoskeletal yeniden düzenlenme ve metabolizmayı düzenler.²⁰⁻²²

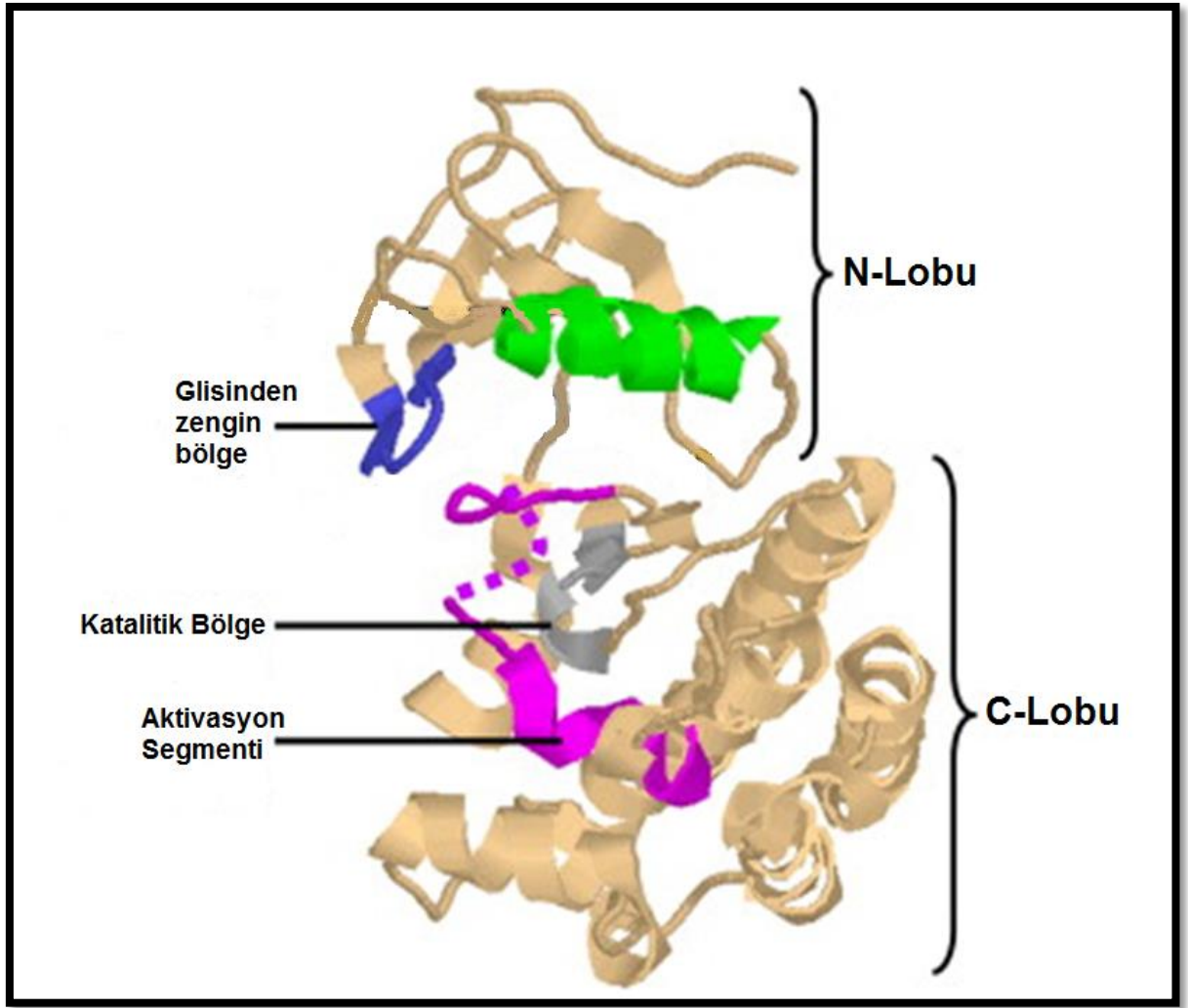
2.2.3. B-RAF Mutasyonları

Hoshino ve ark.ları MAPK sinyal yolağının kanserlerin %30'unda hiperaktif olduğunu göstermiştir.²³ Kanserlerin %15'inde RAS'ı aktive eden mutasyonlar saptanmıştır. Davies ve arkadaşları B-RAF mutasyonları açısından geniş bir kanser hücre dizisini taramış; en yüksek sıklıkta malign melanomda(%59) olmak üzere, kolorektal, akciğer, meme, over, karaciğer kanserleri, gliom ve sarkomlarda değişik oranlarda B-RAF mutasyonu saptamışlardır.²⁴



Şekil-1:MAPK Yolağı (TKR:Tirozin kinaz reseptörü)

Her RAF kinazın 3 adet korunmuş bölgesi(CR) mevcuttur. N-terminalinde bulunan CR1 ve CR2 daha çok düzenleme işlevleriyle ilişkiliyken; C-terminalinde bulunan CR3 kinaz bölgesini içerir. CR1 bölgesinde bulunan RAS bağlayıcı bölge (RBD) ve sistinden zengin bölge (CRD), RAS ve membran fosfolipidleriyle etkileşime girer. CR2 serin/treoninden zengin bölge, CR3 ise protein kinaz aktivitesi olan bölgedir. Tipik olarak protein kinaz bölgesinin küçük bir N-terminal lobu ve geniş bir c-terminal lobu bulunur. Küçük loba glisinden zengin bölge (P-bölgesi) adenosin trifosfat(ATP) ile etkileşirken, geniş lob MEK1/2 ve diğer protein substratlarla etkileşir. Enzim aktivitesi olan bölge küçük ve geniş lobun arasındaki yarıktadır.^{21,22,70}



Şekil-2:B-RAF yapısı²¹

Protein kinazların çoğu aktivasyon segmentlerinde bir veya iki adet fosforilasyon bölgesi bulunur. Bu bölgeler genellikle aynı enzim ailesinin başka üyeleri tarafından fosforile edilerek, aktivasyona neden olur. B-RAF kinaz aktivasyonu için de CR2 bölgesindeki serin ve treonin artıklarının fosforilasyonu gereklidir. B-RAF mutasyonlarının çoğunluğu bu aktivasyon segmentinde veya glisinden zengin bölgede ortaya çıkmaktadır. B-RAF mutasyonlarının %90'ı; ekzon 15'te 1799. pozisyondaki timin nükleotidinin adeninin yerine geçmesi ile 600. lokalizasyondaki valin amino asitinin glutamata değişmesi sonucu gerçekleşir. B-RAF^{V600E} mutasyonu sonrası enzim aktivitesi 500 kata kadar artabilir. Bu da MEK/ERK yolağının devamlı aktivasyonuna, hatta ekstrasellüler herhangi bir uyarı olmadan hücrenin bağımsız farklılaşma ve çoğalma yeteneğine sahip hale gelmesine neden olabilir. B-RAF^{V600E} mutasyonunun karsinogenezdeki bir diğer rolü ise bcl-2 (b cell lymphoma-2) ve

nükleer faktör kappa B (NF-κB) üzerinden olmaktadır. Mutasyon sonucu B-RAF, C-RAF ile dimer oluşturarak transfosforilasyon ile C-RAF aktivasyonu yapar. Aktive C-RAF, MEK aktivasyonu yanında antiapoptotik etkileri olan bcl-2'yi ve NF-κB'yi de tetikler. NF-κB aktivasyonu aynı zamanda çoğalma, angiogenez, invazyon ve metastaz mekanizmalarını da harekete geçirir.^{21,25}

2.2.4. B-RAF Mutasyonlarının Görüldüğü Kanserler

B-RAF^{V600E} mutasyonu; malign melanomda %27-70, tiroid papiller karsinomda %45-53, Langerhans hücreli histiyositozda %53 kolorektal kanserlerde %5-22, over kanserlerinde %30-35, pilositik astrositomlarda %60-80, karaciğer kanserlerinde %22'ye kadar tanımlanmıştır.^{22,25,70-72}

Tümör Tipi	B-RAF Mutasyonu	B-RAF İlişkili Özellikler
Malign Melanom	V600E V600K	%27-70 1/3'ü V600K mutasyonu Daha genç hastalar Prognozu etkiler B-RAF inhibitörleri malign melanomda tedavisinde kullanılmaktadır
Papiller Tiroid Karsinomu	V600E	%45-53 Kötü prognozla birlikte
Langerhans Hücreli Histiyoitoz	V600E	%50 Daha genç hastalar
Kolorektal Karsinom	V600E	%5-22 B-RAF mutasyon pozitifliği Lynch sendromunu dışlar K-RAS/B-RAF birlikte mutasyonları kötü prognozla birlikte
Over Tümörleri	V600E	%30-35 Düşük dereceli seröz karsinom ve seröz borderline tümörlerde Erken teşhis ve iyi prognozla ilişkili
Gliomlar	KIAA1549:B-RAF füzyonu V600E B-RAFins598T	Pilositik astrositomlarda %60-80 Düşük dereceli astrositomların pilositik astrositomlara farklılaşmasına neden olabilir
Hepatobiliyer karsinomlar	V600E	Hepatosellüler karsinomda %22, kolanjiyosellüler karsinomda %23'e kadar pozitif

Tablo-4:B-RAF Mutasyonu Görülen Kanserlerin Klinik Özellikleri^{71,72}

2.3. Hairy Cell Lösemi B-RAF İlişkisi

Hairy cell lösemi yaklaşık 50 yıl önce tanımlanmasına rağmen yakın geçmişe kadar hastalığın patogenezinin sorumlu olabilecek herhangi bir genetik değişiklik tanımlanmamıştı. 2011'de Tiacci ve ark.ları, HCL patogenezinde rolü olan genetik mutasyonları araştırırken, indeks bir vakada WES(Whole Genome Sequencing) yöntemiyle B-RAF^{V600E} mutasyonu saptamışlardır. Bunun üzerine 46 HCL olgusunun daha örneklerinde PCR(Polimerase chain reaction) ve Sanger sequence yöntemiyle B-RAF^{V600E} mutasyonu çalışmışlar ve %100 pozitiflik saptanmışlardır. Bu bulgulardan yola çıkarak, diğer periferik B hücreli lenfoma/lösemi tanılı 193 olgu mutasyon açısından araştırılmış; hiçbir olguda B-RAF^{V600E} mutasyonu saptanmamıştır. Sonuç olarak mutasyonun tüm hastalarda pozitif bulunması, tümör hücre klonunun tümünde bulunması ve diğer periferik B hücre neoplazilerinde negatifliğini vurgulayarak, B-RAF^{V600E}'nin HCL için hastalığı tanımlayıcı bir genetik bozukluk olduğunu öne sürmüşlerdir.¹⁹

Hairy cell lösemide tanımlanan bu mutasyon daha sonra geniş hasta gruplarında çalışılmıştır. Boyd ve ark.ları HRMA(High resolution melting analysis) yöntemiyle, HCL tanılı 48 hastanın örneklerinin tümünde B-RAF^{V600E} mutasyonu saptamıştır.⁷³ Arcaini ve ark.ları 62 HCL olgusunun tümünde B-RAF^{V600E} mutasyonunu pozitif bulmuş, 240 tane HCL dışı B hücreli periferik hücreli neoplazide negatif olarak bildirilmiştir.⁷⁴ Tiacci ve ark.ları 2012'de çalışmalarını genişleterek, 123 HCL olgusunun örneklerini B-RAF^{V600E} açısından AS-PCR (Allel spesifik-PCR) yöntemiyle çalışmış, yine %100 pozitiflik saptamış ve bu yöntemin duyarlılığını da vurgulamıştır.⁷⁵ B-RAF^{V600E} mutasyonlarının HCL ve HCL-V morfolojisi, immunhistokimyası ve immunfenotipi ile korelasyonunun araştırıldığı bir çalışmada, HCL olguları %95,8 mutant, HCL-V hastaları ise B-RAF açısından normal genotipte saptanmıştır. Ayrıca bu mutasyon negatifliğinin HCL-V'ı ayırt etmede en güçlü belirteçlerden biri olduğu ileri sürülmüştür.⁷⁶ Tiacci ve ark.ları RAS-MEK-ERK yolağının HCL olgularında aktive olduğunu gösterebilmek için, olgu serilerinde B-RAF^{V600E} mutasyonları ile ERK fosforilasyonu arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Bu araştırmada aynı zamanda pERK(fosforilize ERK)'in immunhistokimyasal olarak HCL ile HCL benzeri bozuklukların ayırımındaki yeri de sorgulanmıştır. 37 klasik HCL

olgusunun 35'inde, hem diğer periferik B hücreli neoplazilerde saptanmayan pERK ekspresyonu hem de B-RAF^{V600E} mutasyonu görülmüştür. Bu çalışmanın sonucu olarak B-RAF^{V600E} mutasyonu ile pERK arasında sabit bir ilişki olduğu, RAF-MEK-ERK yolağının blokajı için B-RAF ve MEK inhibitörlerinin kullanılabileceği ileri sürülmüştür.⁷⁷ Bu çalışmalardan çıkan ortak sonuç; B-RAF^{V600E} 'nin klasik HCL'de tanı ve ayırıcı tanıda kullanılabilecek bir genetik test olarak rutin kullanıma girmesi şeklindedir. Ayrıca HCL'de her ne kadar pürin analoglarına yanıt oranları yüksek olsa da; bu tedavilerin küratif olmayışı, tedavi sonrası minimal rezidüel hastalık kavramı ve her sıra tedavide yanıt oranlarının giderek düşmesi nedeniyle yeni terapötik arayışlar B-RAF'ı bir tedavi hedefi haline getirmektedir.

Daha önce bahsedildiği gibi pürin analoglarıyla HCL olgularında yüksek tam yanıt oranları ve uzun hastalıksız sağkalım elde edilmektedir. Hatta bazı hastalar bu tedaviler sonrasında normal yaşam süresini tamamlamaktadır. Ancak küçük oranda bir hasta grubunda standart tedavilere direnç ve ölümcül seyir görülebilmektedir. Bu tip hastalarda hedefe yönelik tedavilerin kullanımı söz konusudur. Günümüzde B-RAF^{V600E} mutant malign melanom tedavisine kullanılan ve FDA onaylı bir B-RAF inhibitörü olan vemurafenibin relaps/refrakter HCL'de kullanıldığı olgu bildirileri mevcuttur. Bu olgular genelde pürin analogları, rituksimab, IFN α , splenektomi gibi çoklu sıra tedaviler sonrası relaps/refrakter hastalık sürecinde olup, B-RAF^{V600E} mutasyonu gösterildikten sonra vemurafenib ile tedavi edilmiştir. Verilen vemurafenib dozu 480-960mg/gün arasındadır.⁷⁸⁻⁸² Vemurafenib ile hızla cevap elde edilmiş ve altı aya kadar olan remisyon süreleri elde edilmiştir.⁷⁹

3. ARAŞTIRMA YÖNTEMİ

3.1. Hastalar

Ocak 2000-Aralık 2013 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi(DEÜTF) Hastanesi Hematoloji Polikliniği'nde HCL tanısı alan hastalar retrospektif olarak incelendi. HCL tanısı periferik kan, kemik iliği ve/veya dalak dokusundan (splenektomi yapılan hastalarda) morfolojik ve immunhistokimyasal olarak DEÜTF Patoloji Anabilim Dalı tarafından doğrulanmış 13 hasta çalışmaya dahil edildi. Yaş sınırlaması yoktu. HCL varyant tip dışlandı. Parafin bloktan izole

edilen DNA kalitesinin PCR çalışması için uygun olmadığı hastalar dışlandı. Klinik olarak yaş, cinsiyet, tanıda semptom varlığı, organomegali, lenfadenopati, tanı yeri gibi parametreler incelendi. Hematolojik olarak hastaların tanı anında Hb, lökosit, trombosit, nötrofil, monosit sayıları incelendi. İkincil maligniteler kaydedildi.

3.2. Tedavi

Tüm hastalar yedi gün boyunca 0,1mg/kg/gün devamlı i.v. infüzyon şeklinde kladribin tedavisi aldı. Kladribin tedavisi tüm hastalarda yatarak tedavi şeklinde tek kür verildi. Tedavi süresince günlük tam kan sayımı, böbrek ve karaciğer fonksiyon testleri görüldü. Bir hasta kladribin tedavisi öncesi 11 gün süreyle 4,5mlU/gün dozda s.c. IFN α aldı.

Tam yanıt kriterleri; periferik kan ve kemik iliğinde HCL hücrelerinin kaybolması, tam kan sayımının normalleşmesi, (mutlak nötrofil sayısı>1500/ μ l ve hemoglobin>12gr/dl ve trombosit>150000/ μ l olması) fizik muayene veya görüntüleme yöntemleri ile splenomegali, hepatomegali, lenfadenopati saptanmaması, varsa hastaların tanı öncesi semptomlarının gerilemesi olarak kabul edildi. Kısmi yanıt ise periferik kan ve kemik iliğindeki lösemik hücrelerde %50'nin üzerinde azalma, tam kan sayımının normalleşmesi veya hücre serilerinde %50'nin üzerinde düzelme, dalak karaciğer lenf bezi boyutlarında %50'nin üzerinde küçülme olarak değerlendirildi. Bu kriterler dışında kalanlar yanıtızsız olarak değerlendirildi.³² Hastalar tedavi sonrası aylık olarak fizik muayene, tam kan sayımı, periferik kan yayması ile izlendi. Yanıt değerlendirmesi hastaların sitopenilerinin düzelmesine göre dört veya altıncı ayda yapıldı.³²

3.3. B-RAF Mutasyon Analizi

Dokuz Eylül Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden çalışmaya dahil edilen hastaların parafin blokları çıkarılarak, tanı anında alınan kemik iliği veya dalak doku örnekleri elde edildi. Çalışmada kullanılan örnekler patoloji parafin bloklarında yeterli örnek varsa alındı. Patoloji laboratuvarında mikrotomun alkolle silinmesinden sonra dalak materyallerinden 10 mikron kalınlığında üç kesit, kemik iliği materyallerinden 1 kesit alındı. Alınan kesitler steril ependorf tüplere aktarıldı. Tüplerdeki dokulara Temel Onkoloji Laboratuvarında spin kolum yöntemi ve parafin dokudan DNA

ekstraksiyon kiti kullanarak DNA ekstraksiyonu yapıldı.(QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, Qiagen) Ardından spektrofotometre ile elde edilen DNA'nın miktarı ölçülüp yeterlilik değerlendirildikten sonra bilinen ve bilinmeyen B-RAF mutasyonları pyrosequencing temelli moleküler metotlarla değerlendirildi. Altın standart olarak DNA sekanslama yöntemi kullanıldı. Tüm bu işlemler Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Laboratuvarı'nda yapıldı. Mutasyon analizini yapacak olan araştırmacıların araştırmanın sonuna kadar klinik ve patolojik bulgulardan habersiz olmaları sağlanarak taraf tutma önlenmeye çalışıldı. Çalışmalar sırasında genel laboratuvar güvenlik önlemlerine uyuldu.

3.3.1. Pyrosekanslama Yöntemi

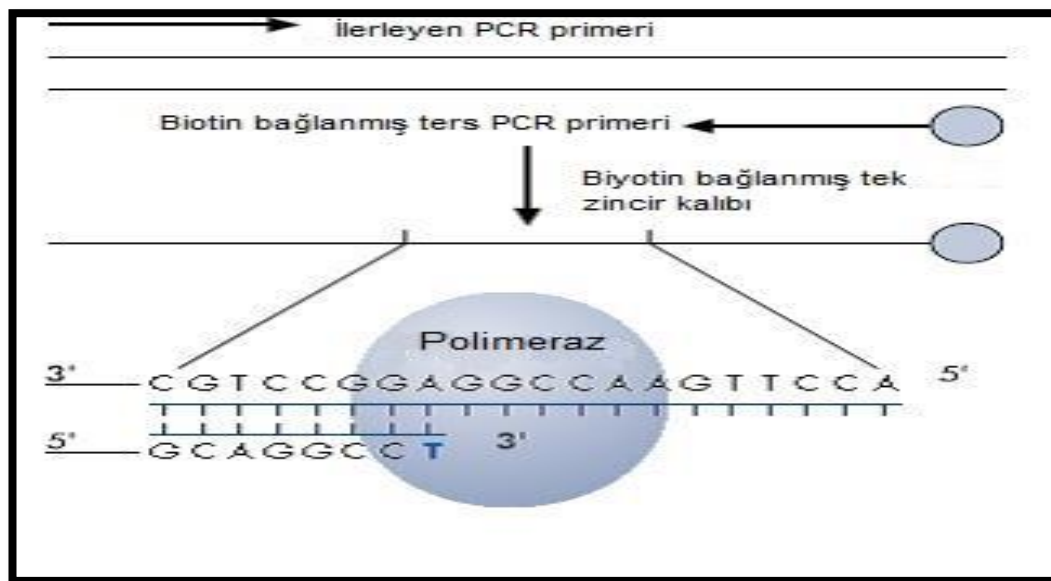
BRAF mutasyonları Qiagen PyroMark Q24 cihazında, Therascreen BRAF Pyrokit 24, V1 (1/2) kiti kullanılarak değerlendirildi. İşlem basamakları;

ADIM 1:

Amplifiye edilen DNA fragman iplikçikleri üzerine biotin bağlanır.

ADIM 2:

Biotin bağlı fragmanlara uygun primerler bağlanır, tek dizi halindeki DNA fragmanı, polimeraz, ATP sülferez, lusiferaz, apiraz hatta APS (adenozin 5'-fosfosülfat) ve luserin ile primer bağlanma sıcaklıklar baz alınarak inkübasyon yapılır.



Şekil-3: DNA ters transkripsiyonu

ADIM 3:

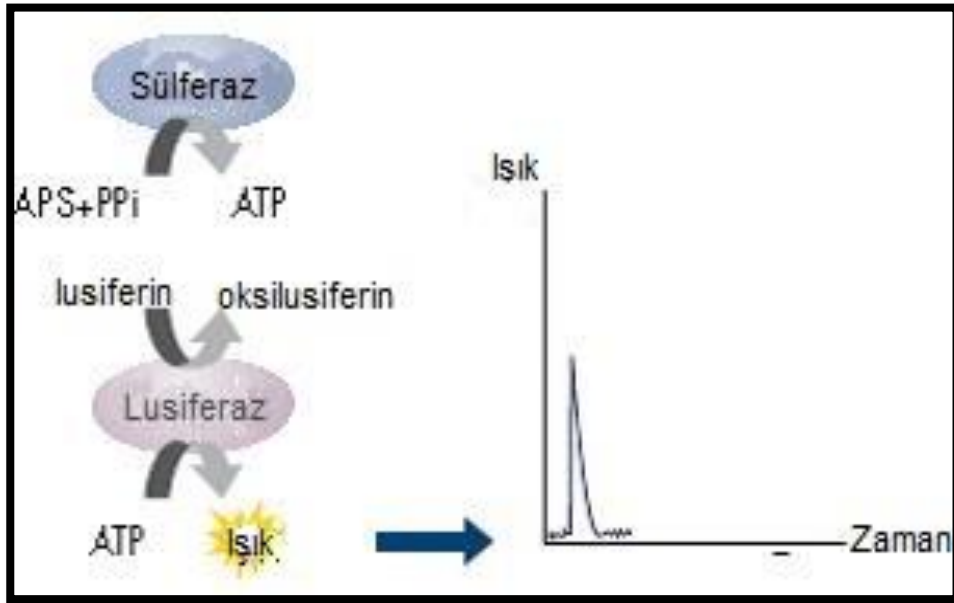
İlk deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP) reaksiyona eklenir. DNA polimeraz, komplementer dizi üzerinde dNTP'yi katalizleyerek zincirin oluşmasını sağlar. Her bir birleşme sırasında pirofosfat (PPi) bağları ayrılır.



Şekil-4: DNA polimeraz reaksiyonu

ADIM 4:

ATP sülferez, PPi molekülünü, ATP'ye çevirir ve APS içinde açığa çıkar. Bu ATP dönüşümü, lusiferinin, lusiferaz aracılığıyla oksilusiferine dönüşmesini sağlayarak, ölçülü olarak ATP'nin ışığa meydana getirmesini sağlar. Bu ışığa lusiferaz kataliz reaksiyonu sonucu CCD (Charge coupled device) sensörleri aracılığıyla algılanır ve software üzerinde dalgalanma (pik) olarak görülür.



Şekil-5: ATP sülferez ve lusiferaz reaksiyonu

ADIM 5:

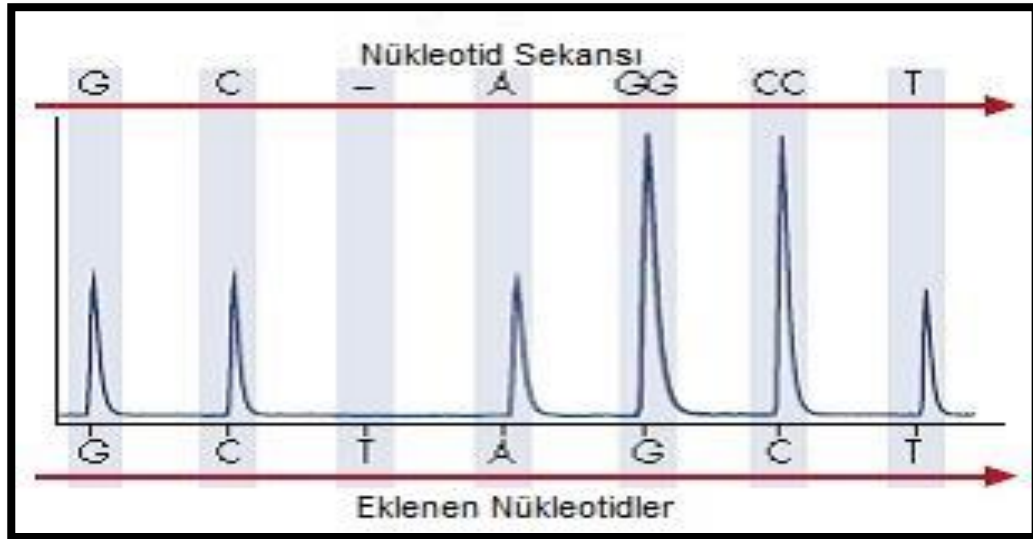
Reaksiyon ortamında serbest bulunan apiraz enzimi, tek sarmal zincirine bağlanmamış nükleotidleri degrade eder, ortama tekrar nükleotid bağlanmasını sağlar. Ayrıca bozunmuş ATP'ler de ortamdan uzaklaştırılır.



Şekil-6: Apiraz reaksiyonu. ADP:Adenozin difosfat, AMP:Adenozin monofosfat

ADIM 6:

Bağlı olan dNTP'ler sekans dizi yöntemiyle gösterilir. Bu aşamanın gerçekleşmesi için lusiferaz tarafından tanımlanmayan, doğal halde bulunan deoksiadenozin trifosfat (dATP) yerine bağlanan deoksiadenozin alfa-thio trifosfatın ortamda kullanılması gerekir.



Şekil-7: Pyrosekans görüntüsü

3.4. İstatistiksel Analiz

Örneklerin işlenmesinden sonra elde edilen mutasyon bilgileri, hastaların demografik ve klinik özellikleri, tedaviye yanıtları gibi veriler SPSS 15.0 programında

değerlendirildi. Sayımla belirtilen değişkenler yüzde dağılımla özetlendi ve Ki Kare Testi ile analiz edildi. Ölçümle belirtilen değişkenler ortanca, minimum ve maximumu değerleri ile özetlendi, analizde Mann Whitney U Testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen hastaların dokuzu erkek, dördü kadındı. Erkek/kadın hasta oranı 2,25/1 olarak saptandı. Hastaların tanı anındaki median yaşı 48'di (37-59). Median izlem süresi 59 (3-96) aydı.

4.1. Klinik Bulgular

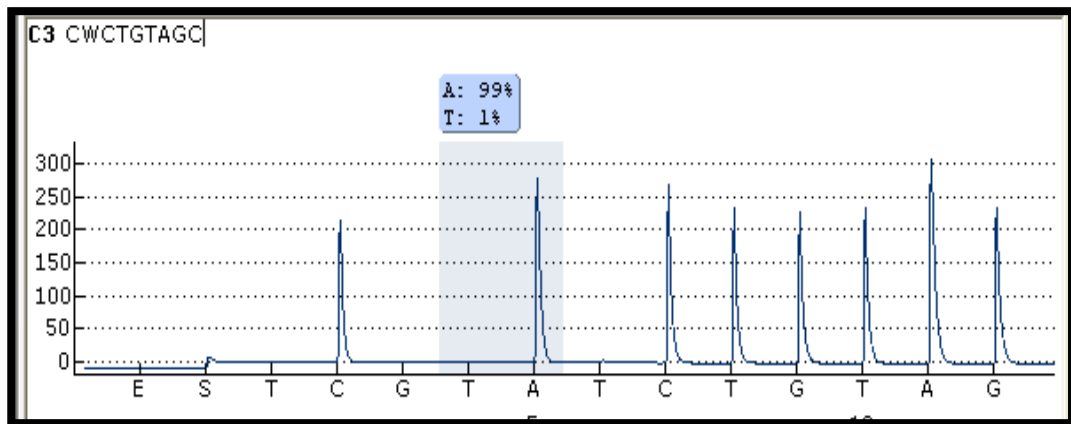
Başvuru anında hastaların %46,2'si(n=6) asemptomatikti. Semptomatik olan yedi hasta halsizlik, sol üst kadranda ağrısı, kilo kaybı, nefes darlığı gibi yakınmalarla başvurmuştu. Bir hastanın başvuru anında kanlı ishal, bir hastanın ise nötropenik ateş ve akciğer enfeksiyonu tablosu mevcuttu. Olguların fizik muayene bulguları değerlendirildiğinde 13(%100) hastada splenomegali, 5(%38,5) hastada hepatomegali, 2(%15,4) hastada ise intraabdominal lenfadenopati saptandı. Hastaların yaklaşık yarısı (%46,2) splenektomi sonrası tanı almıştı. Tanısal amaç dışında tedavi veya palyatif amaçlı splenektomi yapılmamıştı. Sadece bir hastada pansitopeni mevcuttu. Hemogloblin değeri 10'un altında 4 hasta, trombosit değeri 100000'in altında olan 6 hasta vardı. Hastaların %84,6'sı(n=11) lökopenik, bu hastaların 4'ü tanı anında nötropenikti. HCL açısından dikkat çekici bir özellik olan monositopeni 8(%61,5) hastada saptandı. Birer hastada ılımlı ürik asit ve LDH yüksekliği dışında hastaların tümünün AST, ALT, BUN, kreatinin gibi biyokimyasal parametreleri normaldi. Hastalarımızda eşlik eden herhangi bir otoimmün hastalık saptanmazken, olgulardan biri HCL tanısından bir yıl önce başka bir merkezde Mantle hücreli lenfoma tanısıyla tedavi almıştı. Bir hasta ise HCL tanısından hemen önce el dorsal yüzündeki lezyondan Kaposi sarkomu tanısı almıştı. Kaposi sarkomu tanılı hasta izlemde takipleri bıraktı, lenfoma tanısıyla tedavi almış olan hasta ise her iki hastalığı açısından remisyonda izleme devam etti.

4.2. Tedavi ve Yanıtları

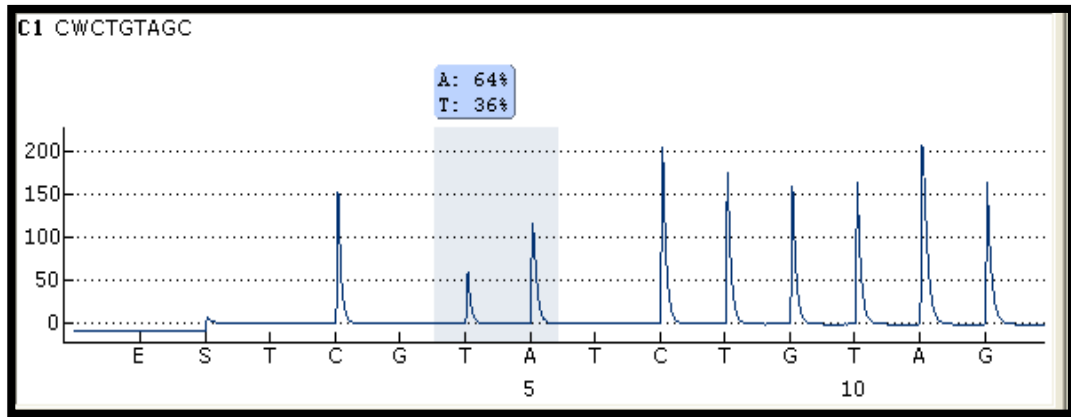
Onbir olgu 0,1 mg/kg/gün 7 gün boyunca devamlı i.v. infüzyon şeklinde kladribin tedavisi aldı. Bir hasta başvuru anında nötropenik ateş ve akciğer enfeksiyonu nedeniyle öncelikle 4,5 mIU/gün IFN α 11 gün süreyle aldıktan sonra diğer hastalarla benzer şekilde i.v. kladribin ile tedavi edildi. Bir hasta ise asemptomatik olması, ılımlı sitopenileri (Hb>10gr/dL, trombosit>100000/ μ L, ANS>1000/ μ L) olması nedeniyle tedavisiz izlendi. İzlemin 12. ayında hematolojik parametreleri kötüleşen hasta progresif hastalık kabul edilerek kladribin tedavisi planlandı. Tez yazım aşamasında hasta henüz tedavisini almamıştı. Tedavi alan onbir hastanın yanıt değerlendirmesi yapılabildi. Bu hastaların tümünde tedavi yanıtı TY olarak değerlendirildi. İzlemde iki hasta takiplere gelmedi. Bu hastalardan biri tam yanıt ile izlenirken 62. aydan sonra hasta takipten çıktı. Diğer hasta ise 3.ayda takibi bıraktığı için yanıt değerlendirmesi yapılamadı. Bu iki olgu dışındaki diğer olgularımızda izlem süresi boyunca relaps veya ölüm görülmedi. Hastaların tümünde TY elde edilmesi ve izlemde takip edilen hastalarda relaps veya ölüm görülmemesi nedeniyle sağkalım analizi yapılamadı.

4.3. B-RAF Mutasyon Analiz Sonuçları

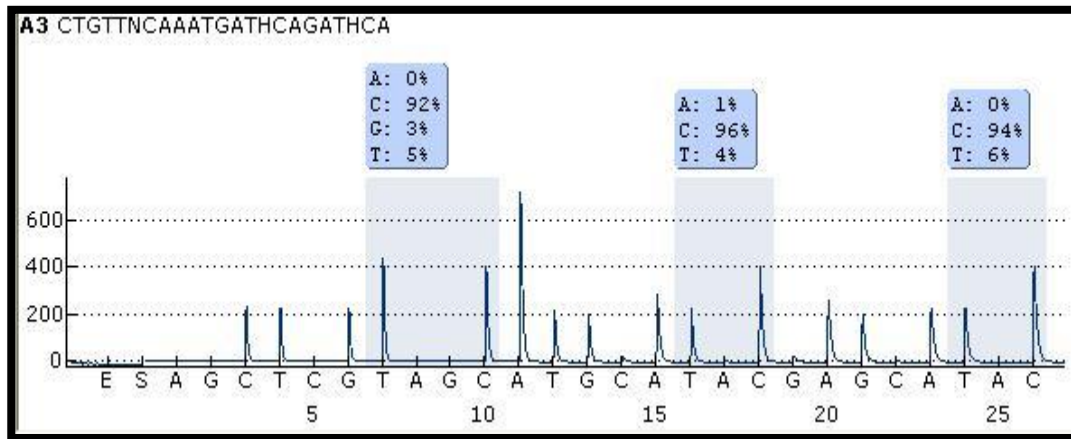
HCL hastalarında sık rastlanan B-RAF^{V600E} mutasyonu 10(%76,9) hastada pozitif bulundu. Üç(%23,1) hastada ise B-RAF 464-469 kodonlarında mutasyon (Bir hastada B-RAF^{G464E}, bir hastada B-RAF^{G466E}, bir hastada B-RAF^{G469E}) saptandı. İki hastada ise her iki mutasyon pozitif. Bu hastaların klinik özelliklerine bakıldığında, diğer hastalara göre dikkat çekici bir farklılık görülmedi.



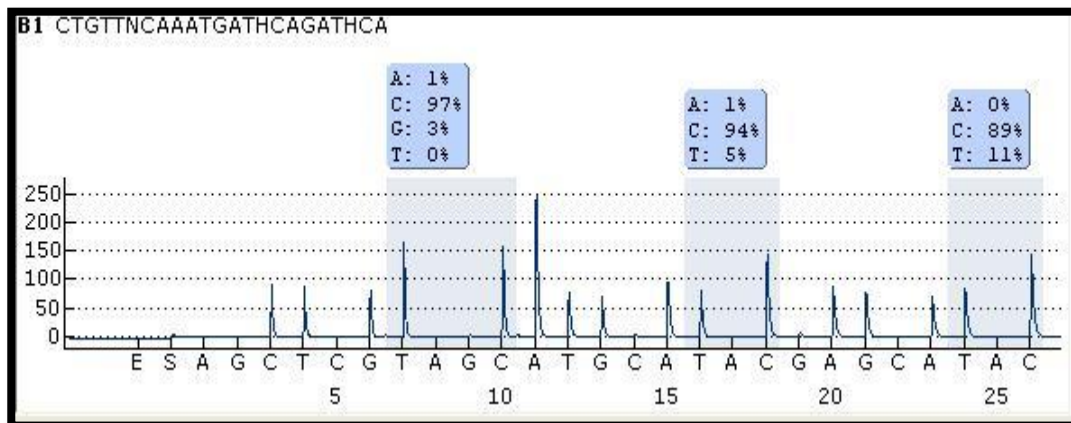
Şekil-8: B-RAF kodon 600 wild tip pyrosekans görünümü



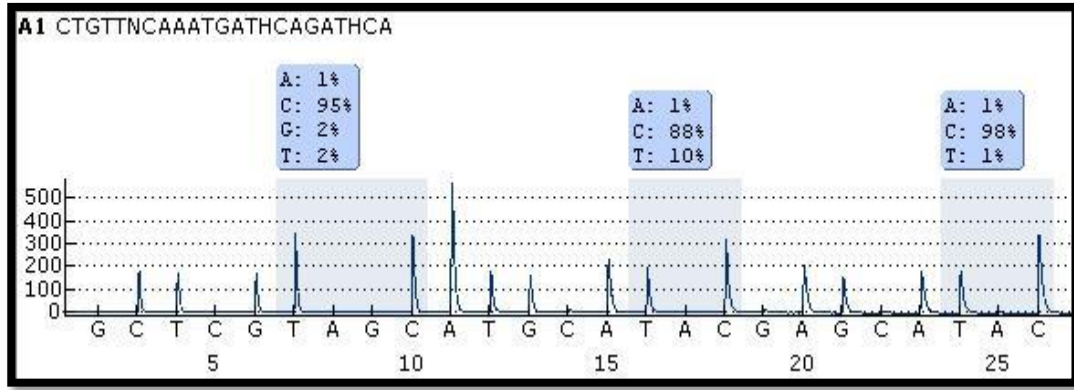
Şekil-9: B-RAF^{V600E} mutasyonu (1799 T>A) görünümü



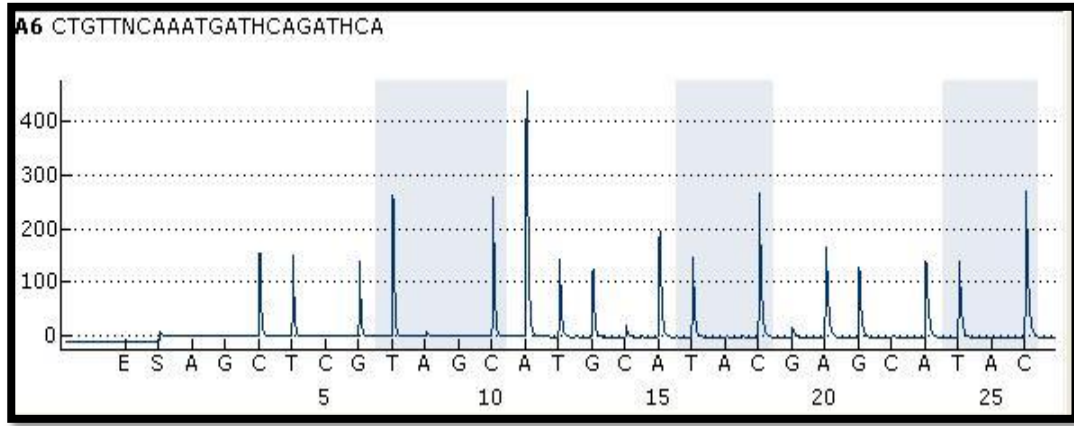
Şekil-10: B-RAF 464-469 kodonları wild tip görünümü



Şekil-11: B-RAF^{G464E} mutasyonu (1391 G>A) görünümü



Şekil-12: B-RAF^{G466E} mutasyonu (1397 G>A) görünümü



Şekil-13: B-RAF^{G469V} mutasyonu (1406 G>T) görünümü

B-RAF mutasyonlarıyla klinik parametreler karşılaştırıldığında, cinsiyete göre B-RAF mutasyonlarının görülme sıklığı her iki mutasyon için kadın ve erkek cins arasında benzerdi. İstatistik desteklemese de lenfadenopati saptanan hastaların tümünde B-RAF^{V600E} mutasyonu pozitif (p=1.000) Benzer bulgular diğer mutasyon için geçerli değildi. B-RAF^{V600E} mutasyonu trombositopenik hastalarda %50 pozitifken, dikkat çekici biçimde trombosit değeri normal olan hastaların hepsinde pozitif (p=0,70) B-RAF^{V600E} mutasyonu pozitif olan 10 hastanın 9'unda lökopeni mevcuttu. B-RAF 464-469 kodonlarında mutasyonu olan hastaların ise tümünün lökopenik ve lenfopenik olduğu görüldü. Hematolojik parametreler ile mutasyonlar arasındaki ilişkilerde istatistiksel anlamlılık yoktu. Tedavi yanıtları B-RAF^{V600E} ve/veya B-RAF 464-469 kodon mutasyonları olan ve olmayan gruplarda benzerdi.

OLGU	DOKU	KODON 600	MUTASYON TİPİ	KODON 464-469	MUTASYON TİPİ
Olgu 1	Dalak	Mutant	1799 T>A	Mutant	1397 G>A
Olgu 2	Dalak	Mutant	1799 T>A	Wild	Wild
Olgu 3	Dalak	Mutant	1799 T>A	Wild	Wild
Olgu 4	Dalak	Mutant	1799 T>A	Wild	Wild
Olgu 5	Dalak	Mutant	1799 T>A	Wild	Wild
Olgu 6	Dalak	Mutant	1799 T>A	Wild	Wild
Olgu 7	Kemik iliği	Mutant	1799 T>A	Wild	Wild
Olgu 8	Kemik İliği	Mutant	1799 T>A	Wild	Wild
Olgu 9	Kemik İliği	Mutant	1799 T>A	Wild	Wild
Olgu 10	Kemik İliği	Wild	Wild	Mutant	1406 G>T
Olgu 11	Kemik İliği	Mutant	1799 T>A	Mutant	1391 G>A
Olgu 12	Kemik İliği	Wild	Wild	Wild	Wild
Olgu 13	Kemik İliği	Wild	Wild	Wild	Wild

Tablo-5: Olgularımızın mutasyon analiz sonuçları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hairy cell lösemi Bouroncle ve ark. tarafından “Lösemik Retiküloendotelyozis” olarak ilk tanımlandığında hastalığın erkeklerde daha sık görüldüğü ve hastaların büyük kısmının orta yaş grupta olduğu bildirilmişti.¹ Hastalarımızın demografik özellikleri değerlendirildiğinde, erkeklerde yaklaşık 2,5 kat fazla görüldüğü ancak erkek baskınlığının literatür verilerine göre daha az olduğu saptandı.^{33,61} Bu farklılığın olgu sayımızın az olmasıyla ilişkili olduğu düşünüldü. HCL hastalarının sıklıkla 50-55 yaşlarında tanı aldığı, hastalarımızın median tanı yaşının bu değere yakın olduğu görüldü.^{3,14,33,61}

Klinik özellikler değerlendirildiğinde hastaların yaklaşık yarısının asemptomatik olduğu, semptomatik hastaların ise literatürde sık görülen yakınmalarla prezente olduğu görüldü.^{33,34,83} HCL hastalarında nötropeni, monositopeni, NK hücre ve dendritik hücre fonksiyon bozuklukları sonucu çoklu immün bozukluklara bağlı artan enfeksiyon sıklığı, serimizde tanı anında %15,4 saptanmış olup literatür ile uyumlu bulundu.^{4,38} Fizik muayene veya radyolojik bulgularla hastalarımızın tümünde saptadığımız splenomegali oranının değişik çalışmalarda %80-93 arasında bildirilmiş olduğu görüldü.^{3-5,56} %25-40 sıklıkla görülen hepatomegali daha az rastlanan bir bulgu olup hastalarımızda %38,5 oranında mevcuttu.^{5,33,83} HCL’de %15 oranında görülen lenfadenopatinin olgularımızdaki sıklığı literatür ile uyumlu saptandı.^{6,33}

Laboratuvar bulguları incelendiğinde pansitopenik hasta sayısı bir olup, literatür verileriyle karşılaştırıldığında belirgin derecede az olduğu görüldü. Pansitopeni %30-70 arasında bildirilmiş olup bu farkın hastaların erken dönemde tanı almış olabileceğinden kaynaklandığı düşünüldü.^{3,6,31,56} Dearden ve ark.ları 242 HCL olgusunda pentostatin ve kladribin tedavilerinin uzun dönem sonuçlarını değerlendirirken, Hb<10gr/dL ve/veya trombosit<100000/dL olan olgularda hastalıksız sağkalımın daha az olduğunu göstermiştir.¹⁴ Tedavi alan 12 hastamızda tedaviye yanıt değerlendirilmesi yapılmış olup tüm hastalarda tam yanıt elde edildi. Yanıt değerlendirmesi yapılan hastalardan ikisi daha sonra takiplere gelmedi, kalan on hastamızda ise relaps veya ölüm görülmedi. Bu nedenle izlem süresi boyunca anemi ve/veya trombositopeni varlığı ile tedavi yanıtları veya hastalıksız sağkalım

arasında ilişki kurulamadı. Bununla birlikte izlem süresi uzatıldığı takdirde bu parametrelerin relaps oranları ve hastalıksız sağkalım açısından anlam kazanabileceği düşünüldü. HCL için tipik bir bulgu olan ve %80-100 oranında görülen monositopeninin hastalarımızda sıklığının %60'larda kalmasının yine hasta sayısının az olmasına bağlı olduğu düşünüldü.^{31,38} Hairy cell lösemi hastalarında hem tanı öncesi hem de tedavi sonrası dönemde ikincil malignitelerin eşlik edebildiği bilinmektedir. Hastalarımız bu yönden araştırıldığında bir hastanın tanıdan bir yıl önce Mantle hücreli lenfoma nedeniyle tedavi gördüğü, bir hastanın ise HCL tanısından hemen önce eşzamanlı Kaposi sarkomu tanısı aldığı görüldü. Her iki kanser tipinin de daha önce HCL ile birlikteliği bildirilmişti.^{17,33} HCL'ye eşlik eden diğer ikincil maligniteler ise değişik serilerde Non-Hodgkin lenfomalar, kronik myeloproliferatif hastalıklar, lösemiler, prostat-akciğer-kolon gibi solid organ tümörleri ve melanom ile melanom dışı deri kanserleri olarak saptanmıştı.^{17,58} İkincil malignitesi olan iki hasta dışındaki hastalarımızın izleminde ikincil bir malignite gelişimi izlenmedi. Bununla birlikte özellikle pürin analoglarının tedavide ilk basamaktaki yerini almasıyla, birçok araştırmacı bu tedavilerin uzun dönem sonuçlarını ikincil maligniteler açısından değerlendirdi. Goodman ve ark.ları kladribin tedavisinin uzun dönem sonuçlarını inceledikleri 209 HCL hastasında ikincil malignite gelişiminin tedavi sonrası ılımlı miktarda (yaklaşık 2 kat) arttığını ve bu riskin tanı öncesi malignite varlığı ve yaş ile ilişkili olduğunu bildirmiştir.¹⁷ Else ve ark.ları ise pentostatin veya kladribin ile tedavi edilen 233 HCL hastasının uzun dönemde ikincil malignite gelişim insidansının aynı yaş ve cinsteki normal popülasyon ile benzer olduğunu belirtmiştir.¹³ Maloisel ve ark.ları pentostatin tedavisi alan HCL hastalarında ikincil malinite insidansının normal popülasyonda beklenenden fazla olmadığını ileri sürmüşlerdir.⁵⁷ İtalya'da yapılan bir çalışmada ise IFN α alan HCL hastalarıyla almayanlar arasında ikincil malignite gelişimi açısından anlamlı fark saptanmadığı görülmüştür.⁸⁴ Tüm bu bulgular ışığında HCL hastalığının veya tedavisinin ikincil malignite riskini arttırdığına dair net bir kanıt olmadığı söylenebilir.

Hairy cell löseminin tanımlandığı yıllarda standart tedavi modalitelerinden biri olan splenektomi 1984'te rekombinant IFN α 'nın, daha sonra da pürin analoglarının protokollere girmesiyle sınırlı endikasyonlar dışında yapılmamaya başlandı.^{41,45}

Çalışmamızda da hastaların yaklaşık yarısında tanısal splenektomi yapılmış, tedavi veya palyatif amaçlı splenektomi yapılmamıştı.

Hastalarımızdan bir tanesi hematolojik değerlerinin ılımlı düşüklüğü ve asemptomatik olması nedeniyle tedavisiz yakın izleme alınmıştı. Tanı anında asemptomatik ve sitopenileri derin olmayan HCL hastalarında yakın tedavisiz izlem yapılabileceği bilinmektedir.^{37,38,46,61} Tedavisiz aylık olarak kontrollere gelen hastamız izlemin 12. ayında progresif hastalık kabul edilerek kladribin tedavisi planlandı, tez yazım aşamasında henüz tedavi verilmemişti. Serimizde onbir hastaya kladribin 0,1 mg/kg/gün i.v. devamlı infüzyon şeklinde; A.B.D’de en sık kullanılan şema ile verilmişti. Goodman ve ark.ları bu şemayla kladribin verdikleri hastalarda %95 TY elde etmiş, izlemde relaps oranını %37 olarak saptamıştı.¹⁷

Kladribin ve pentostatinin karşılaştırıldığı randomize kontrollü çalışma mevcut olmayıp pürin analoglarına yanıt ve toksisite ile ilgili veriler genellikle olgu serilerinden elde edilmektedir.^{14,57,85,86} Else ve ark.ları 233 olguluk serilerinde pentostatin ve kladribin arasında tedavi yanıtları açısından anlamlı fark görülmediğini göstermiştir.¹³ Yine Dearden ve ark.larının 2011’de yayınladığı bir çalışmada da iki ajan açısından benzer sonuçlar bildirilmiştir.¹⁴ Her iki yazar da kladribin ve pentostatini yanıt ve yan etki açısından karşılaştırabilmek için randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç olduğunu vurgulamışlardır.^{13,14} Hastalarımızda kladribin tercih etmemizin nedeni klinik deneyimimizdi. Serimizde kladribin tedavisi alan ve yanıt değerlendirmesi yapılabilen hastalarda %100 olan TY oranı literatür (%95-98) ile benzerdi.^{15,17} Else ve ark.ları hastalıksız sağkalımı etkileyen en önemli faktörün tedavi yanıtı olduğunu bildirmiştir.¹³ Hastaların hiçbirinde relaps saptanmamasının %100 olan tam yanıt oranı ile veya median izlem süresinin kısa olmasıyla ilişkili olabileceği düşünüldü.

Literatürde %100’e kadar pozitif bildirilen B-RAF^{V600E} mutasyonları, olgularımızda %76,9 olarak saptandı.^{19,73,75-77} Bununla birlikte olgularımızdaki sıklık, Shao ve ark.ları (%76) ve Xi ve ark.larının (%79) bulgularıyla benzerdi. Her iki araştırmada mutasyon analizi yöntemimizle benzer şekilde pyrosequencing temelli moleküler metodlarla çalışılmıştı.^{87,88} Diğer çalışmalarda mutasyonlar farklı moleküler metodlarla (Sanger sequencing, Allel spesifik-PCR, High resolution melting anaylse)

analiz edilmişti.^{19,73,75-77} Ancak literatür incelendiğinde pyrosequencing yöntemiyle mutasyon analizi yapılan, %100 pozitiflik saptanan çalışmalar da mevcuttu.^{89,90} Buradan yola çıkarak olgularımızdaki düşük B-RAF^{V600E} mutasyon oranının kullanılan yöntemden bağımsız olduğu düşünüldü. Mutasyon oranlarındaki farkın coğrafi ve ırksal çeşitlilikten kaynaklanabileceği veya hasta sayısının az olmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bu açıdan Türkiye’de yapılacak çok merkezli bir çalışmanın coğrafyamız açısından gerçek rakamları ortaya koyacağı düşünülmüştür.

Olgularımızın daha önce de belirtildiği gibi %15,4’ünde lenfadenopati saptanmıştır. B-RAF^{V600E} mutasyonlarının %100 olduğu çalışmalarda lenfadenopati ile B-RAF mutasyonu ilişki olup olmadığını gösteren bir karşılaştırma doğal olarak yapılmamıştır.^{19,73,75-77,89,90} Ancak mutasyon oranımızın benzer olduğu çalışmalarda da böyle bir karşılaştırma söz konusu değildir.^{87,88} Çalışmamızda ise 13 olgunun üç tanesinde lenfadenopati mevcut olup, bu hastaların tümünde B-RAF^{V600E} mutasyonu saptanmıştır. Bu da olgu sayısı az olmakla birlikte, beraberliği düşündürebilir. Bu öngörünün kesinleşebilmesi için geniş hasta gruplarıyla yapılmış çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır.

İngilizce literatür ve kanserlerdeki somatik mutasyonları barındıran veritabanı (Catalogue of Somatic Mutations in Cancers = COSMIC Database)⁹¹ incelendiğinde; olgularımızda %23,1 saptanan B-RAF 464-469 kodon mutasyonlarının daha önce HCL olgularında tanımlanmamış olduğunu gördük. Bu mutasyonlar HCL için yeni tanımlanmış olup, etnik faktörlere bağlı olabileceği gibi; henüz HCL olgularında hiç bildirilmemiş mutasyonlar da olabilir.

Çalışmamızda B-RAF’ın hairy cell lösemide yüksek sıklıkta ve değişik tipte mutasyonlara maruz kalabilen bir gen olduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle B-RAF^{V600E} mutasyonunun hastalığın tanısını destekleyen bir genetik test olabileceği düşünülmüştür. Tanının tartışmalı olduğu olgularda veya diğer periferik B hücreli neoplazilerin ayırıcı tanısında bu mutasyon güvenilir bir tanı testi olarak kullanılabilir. Yanısıra hedef tedavilerin uygulanacağı olguların seçiminde de önemli bir ayıraç olabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Bouroncle BA, Wiseman BK, Doan CA. Leukemic Reticuloendotheliosis. *Blood*. 1958;13(7):609–630.
2. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, et al. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*. 2006;107(1):265–76.
3. Wanko SO, de Castro C. Hairy cell leukemia: an elusive but treatable disease. *Oncologist*. 2006;11(7):780–9.
4. Hoffman M a. Clinical presentations and complications of hairy cell leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2006;20(5):1065–73.
5. Kraut E. Clinical manifestations and infectious complications of hairy-cell leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2003;16(1):33–40.
6. Allsup D., Cawley J. The diagnosis and treatment of hairy-cell leukaemia. *Blood Rev.* 2002;16(4):255–262.
7. Cassileth PA, Chevart B, Spiers AS, et al. Pentostatin induces durable remissions in hairy cell leukemia. *J. Clin. Oncol.* 1991;9(2):243–246.
8. Spiers AS, Moore D, Cassileth PA, et al. Remissions in hairy-cell leukemia with pentostatin (2'-deoxycoformycin). *N. Engl. J. Med.* 1987;316:825–830.
9. Golomb HM, Dodge R, Mick R, et al. Pentostatin treatment for hairy cell leukemia patients who failed initial therapy with recombinant alpha-interferon: a report of CALGB study 8515. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K.* 1994;8(12):2037–2040.
10. Dearden CE, Matutes E, Hilditch BL, Swansbury GJ, Catovsky D. Long-term follow-up of patients with hairy cell leukaemia after treatment with pentostatin or cladribine. *Br. J. Haematol.* 1999;106(2):515–9.
11. Rafel M, Cervantes F, Beltrán JM, et al. Deoxycoformycin in the treatment of patients with hairy cell leukemia: results of a Spanish collaborative study of 80 patients. *Cancer*. 2000;88(2):352–7.
12. Else M, Ruchlemer R, Osuji N, et al. Long remissions in hairy cell leukemia with purine analogs: a report of 219 patients with a median follow-up of 12.5 years. *Cancer*. 2005;104(11):2442–2448.
13. Else M, Dearden CE, Matutes E, et al. Long-term follow-up of 233 patients with hairy cell leukaemia, treated initially with pentostatin or cladribine, at a median of 16 years from diagnosis. *Br. J. Haematol.* 2009;145(6):733–740.

14. Dearden C, Else M, Catovsky D. Long-term results for pentostatin and cladribine treatment of hairy cell leukemia. *Leuk. Lymphoma*. 2011;52 Suppl 2(June):21–4.
15. Jehn U, Bartl R, Dietzfelbinger H, Haferlach T, Heinemann V. An update: 12-year follow-up of patients with hairy cell leukemia following treatment with 2-chlorodeoxyadenosine. *Leukemia*. 2004;18(9):1476–81.
16. Saven a, Burian C, Koziol J a, Piro LD. Long-term follow-up of patients with hairy cell leukemia after cladribine treatment. *Blood*. 1998;92(6):1918–26.
17. Goodman GR. Extended Follow-Up of Patients With Hairy Cell Leukemia After Treatment With Cladribine. *J. Clin. Oncol*. 2003;21(5):891–896.
18. Kreitman RJ. Immunoconjugates and new molecular targets in hairy cell leukemia. *Hematol. Am Soc Hematol Educ Progr*. 2012;2012:660–6.
19. Tiacci E, Trifonov V, Ph D, et al. Braf mutations in hairy cell leukemia. *N. Engl. J. Med*. 2011;364(24):2305–2315.
20. Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell*. 2004;116(6):855–867.
21. Roskoski R. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2010;399(3):313–7.
22. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*. 2004;6(4):313–319.
23. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, et al. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene*. 1999;18(3):813–22.
24. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949–54.
25. Cantwell-Dorris E, O’Leary J, Sheils O. BRAFV600E: Implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Mol. Cancer Ther*. 2011;10(3):385–94.
26. Schrek R, Donnelly WJ. “Hairy” cells in blood in lymphoreticular neoplastic disease and “flagellated” cells of normal lymph nodes. *Blood*. 1966;27(2):199–211.
27. Güler N, Kansu E, Türker a, Barişta I, Kanra T. Severe autoimmune hemolytic anemia in hairy cell leukemia. *Eur. J. Haematol*. 1997;58(3):205–6.

28. Domingo A, Crespo N, Fernandez de Sevilla A, et al. Hairy cell leukemia and autoimmune hemolytic anemia. 1992.
29. Summers T a, Jaffe ES. Hairy cell leukemia diagnostic criteria and differential diagnosis. *Leuk Lymphoma*. 2011;52 Suppl 2(June):6–10.
30. Bethel KJ, Sharpe RW. Pathology of hairy-cell leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol*. 2003;16(1):15–31.
31. Allsup DJ, Cawley JC. Diagnosis, biology and treatment of hairy-cell leukaemia. *Clin. Exp. Med*. 2004;4(3):132–8.
32. Jones G, Parry-Jones N, Wilkins B, Else M, Catovsky D. Revised guidelines for the diagnosis and management of hairy cell leukaemia and hairy cell leukaemia variant*. *Br. J. Haematol*. 2012;156(2):186–95.
33. Polliack A. Hairy cell leukemia: Biology, clinical diagnosis, unusual manifestations and associated disorders. *Rev Clin Exp Hematol*. 2002;6(4):366–388.
34. Plenderleith I. Hairy cell leukemia. *Can. Med. Assoc. J*. 1970;8(2):129–134.
35. Matutes E, Wotherspoon A, Catovsky D. The variant form of hairy-cell leukaemia. 2003;16(1):41–56.
36. Golomb HM, Catovsky D, Golde DW. Hairy cell leukemia: a clinical review based on 71 cases. *Ann. Intern. Med*. 1978;89:677–683.
37. Robak T. Current treatment options in hairy cell leukemia and hairy cell leukemia variant. *Cancer Treat. Rev*. 2006;32(5):365–376.
38. Goodman GR, Bethel KJ, Saven A. Hairy cell leukemia: an update. *Curr. Opin. Hematol*. 2003;10(4):258–66.
39. Golomb HM. Hairy cell leukemia: lessons learned in twenty-five years. *J. Clin. Oncol*. 1983;1:652–656.
40. Goodman G, Beutler E, Saven A. Cladribine in the treatment of hairy-cell leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol*. 2003;16(1):101–116.
41. Habermann TM. Splenectomy, interferon, and treatments of historical interest in hairy cell leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am*. 2006;20(5):1075–86.
42. Mintz U, Golomb HM. Splenectomy as Initial Therapy in Twenty-six Patients with Leukemic Reticuloendotheliosis (Hairy Cell Leukemia). *Cancer Res*. 1979;39:2366–2370.

43. Golomb HM, Vardiman JW. Response to splenectomy in 65 patients with hairy cell leukemia: an evaluation of spleen weight and bone marrow involvement. *Blood*. 1983;61:349–352.
44. Zakarija A, Peterson L, Tallman M. Splenectomy and treatments of historical interest. *Best Pract. Res. Clin. Hamatology*. 2003;16(1):57–68.
45. Maevis V, Mey U, Schmidt-Wolf G, Schmidt-Wolf IGH. Hairy cell leukemia: short review, today's recommendations and outlook. *Blood Cancer J*. 2014;4(2):1–11.
46. Grever MR, Lozanski G. Modern strategies for hairy cell leukemia. *J. Clin. Oncol*. 2011;29(5):583–590.
47. Adeniji BA, Fallas M, Incerpi M, et al. Laparoscopic splenectomy for hairy cell leukemia in pregnancy. *Case Rep. Med*. 2010;2010:10–12.
48. Quesada JR, Reuben J, Manning JT, Hersh EM, Gutterman JU. Alpha interferon for induction of remission in hairy-cell leukemia. *N. Engl. J. Med*. 1984;310:15–18.
49. Quesada JR, Hersh EM, Manning J, et al. Treatment of hairy cell leukemia with recombinant alpha-interferon. *Blood*. 1986;68(2):493–7.
50. Berman E, Heller G, Kempin S, et al. Incidence of response and long-term follow-up in patients with hairy cell leukemia treated with recombinant interferon alfa-2a. *Blood*. 1990;75(4):839–45.
51. Rai KR, Davey F, Peterson B, et al. Recombinant alpha-2b-interferon in therapy of previously untreated hairy cell leukemia: long-term follow-up results of study by Cancer and Leukemia Group B. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K*. 1995;9(7):1116–1120.
52. Federico M, Frassoldati A, Lamparelli T, et al. Long-term results of alpha interferon as initial therapy and splenectomy as consolidation therapy in patients with hairy cell leukemia. Final report from the Italian Cooperative Group for HCL. *Ann. Oncol*. 1994;5(8):725–731.
53. Spiers AS, Parekh SJ, Bishop MB. Hairy-cell leukemia: induction of complete remission with pentostatin (2'-deoxycofomycin). *J. Clin. Oncol*. 1984;2:1336–1342.
54. Kraut EH, Bouroncle BA, Grever MR. Pentostatin in the treatment of advanced hairy cell leukemia. *J. Clin. Oncol*. 1989;7(2):168–72.
55. Kraut EH, Grever MR, Bouroncle B a. Long-term follow-up of patients with hairy cell leukemia after treatment with 2'-deoxycofomycin. *Blood*. 1994;84(12):4061–3.

56. Cannon T, Mobarek D, Wegge J, Tabbara I a. Hairy cell leukemia: current concepts. *Cancer Invest.* 2008;26(8):860–5.
57. Maloisel F, Benboubker L, Gardembas M, et al. Long-term outcome with pentostatin treatment in hairy cell leukemia patients. A French retrospective study of 238 patients. *Leukemia.* 2003;17(1):45–51.
58. Flinn IW, Kopecky KJ, Foucar MK, et al. Long-term follow-up of remission duration, mortality, and second malignancies in hairy cell leukemia patients treated with pentostatin. *Blood.* 2000;96(9):2981–2986.
59. Grever M, Kopecky K, Foucar MK, et al. Randomized comparison of pentostatin versus interferon alfa-2a in previously untreated patients with hairy cell leukemia: an intergroup study. *J. Clin. Oncol.* 1995;13(4):974–982.
60. Grever MR, Doan CA. Pentostatin in the treatment of hairy-cell leukemia. 2003;16(1):91–99.
61. Swords R, Giles F. Hairy cell leukemia. *Med. Oncol.* 2007;24(1):7–15.
62. Piro LD, Carrera CJ, Carson DA et al. Lasting remissions in Hairy-cell leukemia induced by a single infusion of 2-chlorodeoxyadenosine. *N. Engl. J. Med.* 1990;322(16):1117–1121.
63. Robak T, Błasińska-Morawiec M, Krykowski E, et al. 2-chlorodeoxyadenosine (2-CdA) in 2-hour versus 24-hour intravenous infusion in the treatment of patients with hairy cell leukemia. *Leuk. Lymphoma.* 1996;22(1-2):107–111.
64. Von Rohr A, Schmitz S-FH, Tichelli A, et al. Treatment of hairy cell leukemia with cladribine (2-chlorodeoxyadenosine) by subcutaneous bolus injection: a phase II study. *Ann. Oncol.* 2002;13(10):1641–1649.
65. Juliusson G, Samuelsson H. Hairy cell leukemia: epidemiology, pharmacokinetics of cladribine, and long-term follow-up of subcutaneous therapy. *Leuk. Lymphoma.* 2011;52 Suppl 2:46–9.
66. Zinzani PL, Pellegrini C, Stefoni V, et al. Hairy cell leukemia: evaluation of the long-term outcome in 121 patients. *Cancer.* 2010;116:4788–4792.
67. Kreitman RJ, Arons E, Stetler-Stevenson M, et al. Recombinant immunotoxins and other therapies for relapsed/refractory hairy cell leukemia. *Leuk. Lymphoma.* 2011;52 Suppl 2(June):82–6.
68. Else M, Osuji N, Forconi F, et al. The role of rituximab in combination with pentostatin or cladribine for the treatment of recurrent/refractory hairy cell leukemia. *Cancer.* 2007;110(10):2240–7.

69. Else M, Dearden CE, Matutes E, et al. Rituximab with pentostatin or cladribine: an effective combination treatment for hairy cell leukemia after disease recurrence. *Leuk. Lymphoma*. 2011;52 Suppl 2:75–78.
70. Rahman M a., Salajegheh a., Smith R a., Lam a. KY. B-Raf mutation: A key player in molecular biology of cancer. *Exp. Mol. Pathol.* 2013;95(3):336–342.
71. Pakneshan S, Salajegheh A, Smith RA, Lam AK-Y. Clinicopathological relevance of BRAF mutations in human cancer. *Pathology*. 2013;45(4):346–56.
72. Badalian-Very G, Vergilio JA, Degar BA, et al. Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood*. 2010;116:1919–1923.
73. Boyd EM, Bench AJ, van 't Veer MB, et al. High resolution melting analysis for detection of BRAF exon 15 mutations in hairy cell leukaemia and other lymphoid malignancies. *Br. J. Haematol.* 2011;155(5):609–12.
74. Arcaini L, Zibellini S, Boveri E, et al. Brief report The BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia and other mature B-cell neoplasms. *Blood*. 2012;119(1):188–191.
75. Tiacci E, Schiavoni G, Forconi F, et al. Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF -V600E mutation. *Blood*. 2012;119(1):192–195.
76. Langabeer SE, O'Brien D, Liptrot S, et al. Correlation of the BRAF V600E mutation in hairy cell leukaemia with morphology, cytochemistry and immunophenotype. *Int. J. Lab. Hematol.* 2012;34(4):417–21.
77. Tiacci E, Schiavoni G, Martelli MP, et al. Constant activation of the RAF-MEK-ERK pathway as a diagnostic and therapeutic target in hairy cell leukemia. *Haematologica*. 2013;98(4):635–9.
78. Pentostatin P, Antibody S, Sequencing S. BRAF Inhibition in Refractory Hairy-Cell Leukemia. 2012;2038–2040.
79. Dietrich S, Hülle J, Hundemer M, et al. Continued Response Off Treatment After BRAF Inhibition in Refractory Hairy Cell Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(19):301–3.
80. Samuel J, Macip S, Dyer MJS. Efficacy of Vemurafenib in Hairy-Cell Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2014;370(3):286–288.
81. Izzo C, Nava I, Duca L, Cappellini MD. Rapid response of biallelic BRAF V600E mutated hairy cell leukaemia to low dose vemurafenib. 2013;2011–2014.

82. Maurer H, Haas P, Wengenmayer T, et al. Successful vemurafenib salvage treatment in a patient with primary refractory hairy cell leukemia and pulmonary aspergillosis. *Ann. Hematol.* 2013;7–8.
83. Bouroncle BA. Leukemic reticuloendotheliosis (Hairy cell leukemia). *Blood.* 1979;53(3):412–436.
84. Follow-up LL, Federico BM, Zinzani PL, et al. Risk of Second Cancer in Patients With Hairy Cell. 2002;20(3):638–646.
85. Golomb HM. Hairy cell leukemia: treatment successes in the past 25 years. *J. Clin. Oncol.* 2008;26(16):2607–9.
86. Grever MR, Zinzani PL. Long-term follow-up studies in hairy cell leukemia. *Leuk. Lymphoma.* 2009;50 Suppl 1(October):23–26.
87. Xi L, Arons E, Navarro W, et al. Both variant and IGHV4-34-expressing hairy cell leukemia lack the BRAF V600E mutation. *Blood.* 2012;119:3330–3332.
88. Shao H, Calvo KR, Grönborg M, et al. Distinguishing hairy cell leukemia variant from hairy cell leukemia: Development and validation of diagnostic criteria. *Leuk. Res.* 2013;37(4):401–409.
89. Laurini J a, Aoun P, Iqbal J, Chan W, Greiner TC. Investigation of the BRAF V600E mutation by pyrosequencing in lymphoproliferative disorders. *Am. J. Clin. Pathol.* 2012;138(6):877–83.
90. Verma S, Greaves WO, Ravandi F, et al. Rapid detection and quantitation of BRAF mutations in hairy cell leukemia using a sensitive pyrosequencing assay. *Am. J. Clin. Pathol.* 2012;138(1):153–6.
91. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer.