

T.C.
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİDE
PLAZMA CCL3 DÜZEYİNİN
PROGNOZLA İLİŞKİSİ**

İÇ HASTALIKLARI
UZMANLIK TEZİ

Dr. Dilek KESKİN

TEZ DANIŐMANI: Prof. Dr. TEOMAN SOYSAL

İSTANBUL - 2014

TEŞEKKÜR

Eđitim sürem boyunca ve tez çalışmamda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yetişmemde büyük emeği geçen sayın İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı, Hematoloji Bilim Dalı Başkanı ve tez hocam Prof. Dr. Teoman Soysal'a

Örneklerin saklanması, işlenmesi ve sonuçların elde edilmesinde yardımcı olan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Hafize Uzun'a ve Dr. Müge Kutnu'ya

Tezimi hazırlamada yardımcı bulunan sevgili meslek arkadaşım, yol arkadaşım Dr. Sinem Nihal Esatođlu'na

Örneklerin toplanmasında emeği geçen Hemşire Nazik Çoraksarı başta olmak üzere tüm İç Hastalıkları Anabilim Dalı fedakar hemşirelerine

Tez istatistiğinin yapılmasında desteğini esirgemeyen Uz. Dr. Mahir Cengiz'e

Eđitim hayatım süresince bana katlanan, büyümem ve yetişmemde katkıları olan tüm hocalarıma

Aralarında olmaktan mutlu olduğum tüm asistan arkadaşlarıma ve uzmanlarıma

Benimle düşünen, benimle hareket eden ve kalbi benimle beraber atan canım arkadaşım, yakın dostum ve kız kardeşim Aylin Sevim'e

Hayatım boyunca sonsuz destek ve sevgi veren, her adımda yürek, her adımda akıl, her adımda cesaret veren canım, kıım aileme

Teşekkür ederim.

Dr. Dilek Keskin

KISALTMALAR

KLL	: Kronik lenfositik lösemi
CCL3	: C - C motif ligand 3
CCL4	: C - C motif ligand 4
CCL22	: C - C motif ligand 22
MIP-1 α	: Makrofajinflamatuar protein - 1 α
del17p	: 17. Kromozomun kısa kolunda delesyon
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
LDH	: Laktatdehidrogenaz
ZAP-70	: Zetazinciri ilişkili protein kinaz 70
β 2-mikroglobulin	: Beta-2 mikroglobulin
LDT	: Lökosit sayısının iki katına çıkma zamanı (doubling time)
IgVH	: İmmünglobulin ağır zinciri
DBBHL	: Diffüz Büyük B hücreli lenfoma
KBY	: Kronik böbrek yetersizliği
CXCR3	: C- X- C motif reseptör 3
CXCR4	: C- X- C motif reseptör 4
CXCR5	: C-X-C motif reseptör 5
CXCR12	: C- X- C motif reseptör 12
BcR	: B lenfosit antijen reseptör
MHC	: Majör doku uygunluk grubu
GM	: Germinal merkez
TKİ	: Tirozin kinaz inhibitörü

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
KISALTMALAR	iii
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
GRAFİKLER LİSTESİ.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. KLL VE EPİDEMİYOLOJİ	2
2.2. KLL VE PATOGENEZ	2
2.3. KLL VE TANI / TEDAVİ.....	3
2.3.1. TEDAVİ ENDİKASYONLARI.....	4
2.4. KLL VE PROGNOZ.....	4
2.4.1. EVRE.....	5
2.4.2. LDH.....	5
2.4.3. LDT	6
2.4.4. B2-MİKROGLOBULİN	6
2.4.5. IGVH MUTASYON DURUMU.....	6
2.4.6. ZAP70	7
2.4.7. CD 38	7
2.4.8. KEMİK İLİĞİ TUTULUM PATERNİ	8
2.4.9. SİTOGENETİK.....	8
2.5. KLL VE CCL3	9
3. YÖNTEM VE GEREÇLER	12
3.1. YÖNTEM.....	12

3.1.1. ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLME KRİTERLERİ	12
3.1.2. KONTROL GRUBU İÇİN ÇALIŞMADAN DIŞLANMA KRİTERLERİ	12
3.1.3. ÇALIŞMANIN İŞLEYİŞİ.....	12
3.1.3.1. PLAZMA CCL3/MIP-1 α ANALİZİ	13
3.1.3.2. PRENSİP	13
3.1.3.3. HESAPLAMA	14
3.1.4. İSTATİSTİK	14
3.2. GEREÇLER	14
4. BULGULAR.....	16
5. TARTIŞMA.....	23
6. ÖZET	28
7. SUMMARY	29
8. KAYNAKLAR	30

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. KLL Tanı ve tedavi Kriterleri (NCI-IWCLL)	3
Tablo 2. KLL evreleme sistemleri	5
Tablo 3. Evre ve ortalama sağkalım süreleri	5
Tablo 4. KLL de sık görülen sitogenetik belirteçler ve özellikleri	9
Tablo 5. Hasta ve kontrol grubunun özellikleri	16
Tablo 6. KLL tanısı Roc analizi.....	18
Tablo 7. Hasta grubu plazma CCL3 düzeyi ile prognoz göstergelerinin özellikleri	19
Tablo 8. Hasta grubu tedavi gereksinimi ile CCL3 ilişkisi.....	20
Tablo 9. Hasta grubu sağ kalım ile plazma CCL3 ilişkisi	21
Tablo 10. Plazma CCL3 düzeyi-sağkalım lojistik regresyon analizi.....	21
Tablo 11. Plazma CCL3 (>35,85 pg/ml) düzeyi ile diğer prognoz göstergeleri arasındaki korelasyon tablosu	22

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: CCL3'ün KLL patogenezindeki yeri*	10
Şekil 2. Hastaların Rai evresine göre dağılımı	17
Şekil 3. Hastaların Modifiye Rai evresine göre dağılımı.....	17
Şekil 4. Hastaların Binet evresine göre dağılımı	17
Şekil 5. KLL tanısı Roc eğrisi	18



GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 1. CCL3/MIP-1 α standart eğrisi..... 14



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik lenfositik lösemi (KLL) erişkinde en sık görülen ve kliniği oldukça değişkenlik gösteren lenfoproliferatif hastalıklardan biridir.

Hastaların önemli bir kısmı hastalık süresince hiç tedavi almazken bir kısmı zaman içinde tedaviye ihtiyaç duyar. Tedavi ihtiyacını öngörmeye bir kısmı hastalığın biyolojisinden kaynaklanan çeşitli prognostik belirteçler mevcuttur. KLL’de halen kullanılan çeşitli prognostik belirteçler hastalık seyri ve sağ kalım ile ilgili aydınlatıcı önbilgiler verse de standardizasyon yokluğu, tetkiklerin uygulanabilirliğinde güçlük ve maliyetten doğan sorunlar nedeniyle bir kısmı yaygın olarak kullanılamamaktadır.

Son yapılan çalışmalar KLL patogenezinde mikroçevrenin önemini göstermiştir. Aynı zamanda mikroçevre elemanlarını hedef alan tedavilerin hastalığın seyrini değiştirebileceğine dair veriler saptanmıştır.

C-C motif ligand 3(CCL3) kemokini, KLL patogenezinde BcR sinyali yolu üzerinden monoklonal B-KLL hücrelerinin etraf destek doku ile iletişiminden, sağ kalımından sorumlu sitokinlerden biridir. KLL prognozunun tayininde kullanılacak bağımsız, ucuz ve güvenilir yeni bir belirteç olabileceğine işaret eden bazı yayınlar nedeniyle önemlidir.

Çalışmanın amacı, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı’nda takip edilen ve çalışma için izin veren KLL hastalarının plazma CCL3 düzeyini belirlemek, diğer prognostik belirteçlerle karşılaştırmak ve prognostik önemini saptamak ve bu konuda Türkiye’de yapılan ilk çalışma verilerini ortaya koymaktır.

Çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir(Proje no:19569).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KLL ve EPİDEMİYOLOJİ

KLL, küçük, olgun morfolojide ve yaşam süresi uzun B lenfositlerin monoklonal neoplastik bir hastalığıdır. Erişkinde görülen en sık lösemi tipidir. Batı toplumlarında insidansı 4/100000 olup yaş ilerledikçe artmaktadır. Tanı yaşı 67-72 arasındadır. Erkek / kadın oranı 1.7/1 dir. Bu hastalık, çevre kanında mutlak lenfosit sayısında artış, kemik iliğinde lenfosit infiltrasyonu, lenfoid organlarda büyüme ve çeşitli immünolojik bozukluklarla kendini gösterir(1,2,4).

2.2. KLL ve PATOGENEZ

KLL, CD5+ ve CD23+ B lenfositlerinin kan, kemik iliği, lenf nodu ve dalakta klonal çoğalması ve birikimi ile karakterizedir(4,5). KLL de B lenfositleri CD5, CD 19, CD20 ve az sayıda yüzey Ig eksprese ederler. Bu fenotipik özellikler normal B lenfositlerinden ve alt gruplarından ayrılmalarını sağlar(3,5).

B lenfosit antijen reseptör (BcR) sinyali tümöral hücrelerin çoğalmasını ve sağ kalımını etkileyen temel faktörlerden biridir. Gen ekspresyon profil çalışmaları, KLL hücrelerinden izole edilen lenfoid dokularda BcR sinyal ileti yolunun oldukça aktif olduğuna dair kanıtlar sunmuştur. Bununla beraber BcR sinyali mikroçevre ile etkileşimde aktif rol oynamaktadır(3).

KLL den sorumlu olan klonal B lenfositleri uzamış sağ kalım ve apoptoza direnç özellikleri ile tanınmaktadır. İn vitro çalışmalarda CD5+, CD23+ KLL hücreleri kültüre edildiğinde, hızla spontan apoptozun olduğu ancak ortama çeşitli destek hücreleri eklendiğinde apoptozun azaldığı gösterilmiştir. Aynı çalışmalarda KLL hücrelerinin sayısında, göçünde ve yuvalanmasında artış görülmüştür. KLL hücrelerinin düzen içinde bulunduğu saptanmıştır. Bu sürecin uyum içinde sürmesinden sorumlu olan elemanların kemokinler olduğu bilinmektedir. CXCR3, CXCR4, CXCR5 kemik iliği stromal hücrelerinde ve KLL hücrelerinde bulunan kemokin reseptörleridir. CXCR12 kemik iliği dışı dokulardan salınmaktadır. CXCR12 in vitro ortamda stromal hücrelere giden sinyali potansiyalize ederek KLL hücrelerini apoptozdan korumaktadır. CXCR4 ise hücrelerin spesifik alana göç ve yuvalanmasını kontrol ederek apoptotik ortamdan kaçmalarına yardımcı olur. Ayrıca KLL hücrelerinden CCL3, CCL4, CCL22 isimli kemokinler salınmaktadır. Mikroçevre ve tümöral hücrelerin ortak hareketini sağlayan

bu sitokinler, KLL hücre adezyonundan başlayarak göçe kadar her basamaktaki biyolojik işlemde görev alırlar(3).

2.3. KLL ve TANI / TEDAVİ

Güncel olarak kullanılan, National Cancer Institute-ABD (NCI) destekli uluslararası KLL çalışma grubu (IWCLL) tarafından 2008 yılında hazırlanan tanı kriterleri Tablo 1’ de verilmiştir(1).

Tablo 1. KLL Tanı ve tedavi Kriterleri (NCI-IWCLL)

1-“B” Lenfositoz: $\geq 5 \times 10^9$ /L (en az 3 aydan beri) Not: Kemik iliğinin tipik KLL lenfositleri ile infiltrasyonuna bağlı sitopeni varlığında periferik kanda lenfositoz sayı şartı aranmaksızın KLL tanısı konabilir. Tanı için kemik iliği biyopsisi yapılması gerekmez. Kemik iliğinde %30 ve üzerinde KLL hücresi tutulumu vardır.
2- Lenfositlerin klonal B-lenfositler olduğunun akış sitometrisi ile gösterilmesi: En az 1 adet “B” hücre işareti (ör:CD19, CD20,CD23) + CD5 ve yüzey Ig hafif zincir klonalitesi (kappa veya lambda).
3- Atipik hücre oranı (ör: prolenfosit): < % 55

Kısaca tanımlanırsa tanı için periferik kanda en az üç aydır süren B lenfositozun $\geq 5 \times 10^9$ /L olması ve bu lenfositlerin klonalitesinin immunofenotipik olarak kanıtlanmış olması gerekir(4).

Periferik kanda dolaşan lösemik hücreler küçük, olgun görünümlü, dar sitoplazmalı ve yer yer kondanse olmuş nukleolleri olabilen yoğun nukleuslu hücrelerdir(4).

KLL hastaları lenfadenomegali, hepatosplenomegali, enfeksiyon veya gece terlemesi, ateş, kilo kaybı ve halsizlik gibi sistemik semptomlarla prezente olabilirler.Bazen otoimmün fenomenler ilk bulgu olabilir. Bununla beraber bazı serilerde hastaların % 80’ ine varan oranı asemptomatik olup insidental olarak tam kan sayımı bulgularıyla tanı alır(6).

Hastaların büyük çoğunluğu tanı sırasında tedavi almaz. Fakat küçük bir kısmına tanı sırasında tedavi gerekir. Başlangıçta tedavi gereksinimi olmayan olguların bir kısmı

zaman içinde ilerleyerek tedavi gereksinimi ortaya çıkabilir. Aşağıdaki durumlardan birinin varlığında tedavi endikasyonu ortaya çıkar(1,4):

2.3.1. Tedavi Endikasyonları

1. Aşağıdaki hastalık semptomlarından en az birisinin varlığı
 - > %10 kilo kaybı (6 ayda)
 - Günlük, olağan aktiviteyi engelleyecek düzeyde halsizlik (ECOG II veya daha kötü)
 - İki hafta veya daha fazla süren, enfeksiyonla ilişkisi gösterilemeyen ateş
 - Enfeksiyonla ilişkisiz, 1 aydan fazla süreli gece terlemesi
2. Anemi/trombositopeni oluşması veya derinleşmesi şeklinde ilerleyici kemik iliği yetersizliği bulgusu
3. Kortikosteroid tedaviye yanıtız otoimmün hemolitik anemi ve/veya trombositopeni
4. Kosta kenarını >6cm geçen, masif veya semptomatik veya ilerleyici splenomegali
5. En uzun çapı >10cm olan masif veya semptomatik, veya ilerleyici lenfadenomegali
6. İki ay içinde %50 artan ilerleyici lenfositoz veya tahmini LDT < 6 ay
7. Yukarıdaki kriterler mevcut değilse belirgin hipogamaglobulinemi veya monoklonal protein oluşumu tedavi için yeterli gerekçe değildir.

Not: Lenfosit sayısı tek başına tedavi gerekçesi olarak alınmamalı genel klinik tablo içinde değerlendirilmelidir.

2.4. KLL ve PROGNOZ

KLL hastalarının medyan yaşam süresi 10 yıldır fakat hastadan hastaya farklılıklar olabilir. Hastaların çoğu ve tedavi eden hekim tanı konulduktan sonra tedavi alıp almayacaklarına veya hastalıklarının nasıl bir hastalık olduğuna, seyrinin nasıl gideceğine ait bir takım sorulara cevap aramaktadırlar.

2.4.1. Evre

Hastalığın prognozunu en iyi belirleyen göstergelerden biri hastalık evresidir. Bu nedenle yaygın olarak Binet ve modifiye Rai evreleme sistemleri kullanılmaktadır. Evreleme sistemleri Tablo 2’de gösterilmiştir(1):

Tablo 2. KLL evreleme sistemleri

Rai Evrelemesi			Binet Evrelemesi		
Düşük	0	Lenfositoz ($>5.000/mm^3$)	A	Hb \geq 10 gr/dl Plt \geq 100.000/ mm^3	<3 lenf düğüm bölgesinde tutulum
Orta	1	Evre 0 + lenfadenomegali	B	Hb \geq 10 gr/dl Plt \geq 100.000/ mm^3	≥ 3 lenf düğüm bölgesinde tutulum
	2	Evre 0-1 + splenomegali ve/veya hepatomegali			
Yüksek	3	Evre 0-2 + anemi (Hb $<$ 11 gr/dl)	C	Hb $<$ 10 gr/dl Plt $<$ 100.000/ mm^3	Tutulu alan sayısı önemli değil
	4	Evre 0-3 + trombositopeni ($<100.000/mm^3$)			

Hastaları ortalama sağ kalım beklentisi Tablo 3’de gösterilmiştir(8):

Tablo 3. Evre ve ortalama sağ kalım süreleri

Risk grubu	Ortalama sağ kalım(ay)	Risk grubu	Ortalama sağ kalım(ay)
<i>Rai</i>		<i>Binet</i>	
O Düşük	>150	A Düşük	Ulaşılamadı
I Orta	101	B Orta	84
II Orta	71	C Yüksek	24
III Yüksek	19		
IV Yüksek	19		

2.4.2. LDH

Laktat dehidrogenaz, hücre yapım- yıkımını gösteren sitozolik bir enzimdir. Ucuz olduğu için yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat özgül değildir. Agresif giden KLL de

yükselme eğiliminde olup bu nedenle kötü gidişi tayin edebilir. Yüksek LDH düzeyi Richter Sendromu gelişim riski ile koreledir(7,8).

2.4.3. LDT

Lenfosit doubling time, lenfosit sayısının ikiye katlanması için geçen zamana denilmektedir. Kısa LDT, yüksek proliferasyon hızı ve agresif hastalık ile ilişkilidir. Erken evre hastaların seyrini tahmin etmek yerine agresif gidenlerin durum değerlendirilmesinde kullanılması tavsiye edilmektedir(7).

2.4.4. β 2-mikroglobulin

β 2-mikroglobulin, çekirdekli hücrelerde sınıf 1 MHC α -zinciri ile nonkovalan bağlı olarak eksprese edilen membran ilişkili proteindir. Serum β 2-mikroglobulin düzeyi evre, kemik iliği tutulum paterni ve yoğun kütleli hastalık ile ilişkilidir. Tümör yükünü gösteren belirteçlerin arasındadır. Yüksek β 2-mikroglobulin düzeyi ileri evre ve yüksek tümör yükü olan hastalarda görülmektedir(8).

2.4.5. IgVH mutasyon durumu

B lenfositleri gelişiminde, ilk olarak antijenle uyarılmış B hücreleri sekonder lenfoid organlarda bulunan lenfoid foliküllere giderler. T lenfositleri ve antijen sunan dendritik hücre önderliğinde germinal merkezler şekillenir. Afinite olgunlaşması germinal merkezde olur. Olgunlaşma görevi, immunglobulin geni değişken bölgesinde oluşan random somatik mutasyonlar tarafından gerçekleştirilir. Sonuç olarak antijen bağlayacak antikörlerin afinitesinde değişiklikler sağlanır. Yalnızca antijen bağlama afinitesi yüksek olan B hücreleri yaşamını devam ettirerek farklılaşmasını tamamlayabilir. Gerekli somatik hipermutasyonların sadece germinal merkezde sınırlı olmadığı yönünde kanıtlar mevcuttur. Ayrıca GM dışında IgVH geni mutasyonları olduğu kabul edilmektedir(7,8).

Yapılan çalışmalar sonucunda, mutasyonsuz IgVH durumunda hastalığın daha ağır seyrettiği saptanmıştır(7,8). Aynı çalışmalarda mutasyonu olmayan hastaların yüksek riskli sitogenetik özellikler taşıdığı da görülmüştür. Mutasyonlu IgVH geni olanlarda daha uzun sağkalım süresi tespit edilmiştir. Altın standart prognoz parametresi olarak kabul edilmesine rağmen saptanmasının teknik zorluğu yaygın kullanımını engellemektedir. Bir diğer dezavantajı ise yüksek maliyet yüküdür. Bu sebeplerle IgVH mutasyonunu ile aynı ölçüde prognoz değeri olan veya mutasyonlu ve mutasyonsuz

hücre popülasyonu varlığına göre değişkenlik gösterdiği iddia edilen Zeta zinciri ilişkili protein kinaz 70,CD38 gibi belirteçler üzerinde durulmuştur. Ancak CD38 düzeyinin IgVH mutasyonu ile tam bir ilişki göstermediği anlaşılmıştır(7,8).

2.4.6. ZAP70

ZAP70, doğal katil hücreler ve T lenfositleri tarafından eksprese edilen tirozin kinazlardan biridir. Zeta zinciri ilişkili protein kinaz 70 olarak bilinmektedir. ZAP70, T lenfositleri için merkezi roledir ve hücre göçü, apoptoz, T hücre reseptör sinyalizasyonu, T hücre aktivasyonu işini üstlenmektedir. Bunun dışında klonal B hücreleri ve normal B hücreleri çeşitli farklılaşma safhalarında ZAP70 eksprese ederler. ZAP70, BcR sinyalinin taşınmasında görevlidir(7).

İlk defa Rosenwald ve arkadaşları tarafından tanımlanan ZAP70' in, IgVH mutasyonu yokluğunda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular ışığında IgVH mutasyonu varlığında ZAP70 eksprese edilmediği kabul edilmiştir. Mutasyon durumunu saptamak yerine aynı yönde bulgu verebilen bir belirteç olarak kullanılmaktadır. ZAP70 eksprese eden KLL hastalarında kötüleşmenin daha hızlı ve sağkalımın daha düşük olduğu görülmüştür(7).

2.4.7. CD 38

45 kDA ağırlığında transmembran glikoprotein özelliğindeki CD38, hem reseptör hem de enzim olarak çalışmaktadır. İntrasellüler kalsiyum seviyesini ayarlamaktan sorumludur. Ayrıca hücre adezyonunun sağlanmasında görevli yüzey reseptörüdür(7,8).

CD38 ekspresyonu ile mutasyon durumu arasında güçlü bir korelasyon bulunduğu ilk defa Damle ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir(7,8).CD38 ekspresyonu pozitif vakalarda mutasyonsuz IgVH geni, CD38 ekspresyonu negatif vakalarda mutasyonlu IgVH geni bulunmuştur. Sonraki çalışmalarda ilişkinin kesin olmadığı, CD38' in hastalık seyri süresince değişkenlik gösterdiği ve bu nedenle IgVH yerine kullanılmasının uygun olmadığı ve bağımsız bir prognoz göstergesi olarak kullanılmasının daha uygun olacağı bildirilmiştir(7,8).

KLL de CD38 varlığı araştırılırken dikkat edilmesi gereken üç önemli husus bulunmaktadır:

1. CD38 ekspresyonu zaman içinde değişebilir.

2. CD38 için cutoff değerleri farklılık gösterebilir.
3. Bazı vakalarda CD38 ekspresyonunda bimodal profil bulunabilir.

Belirtecin muğlak oluşu IgVH durumunu belirlemeyi güçleştirmektedir. Aksini savunan çalışmalar mevcuttur. Akış sitometrisi ile değerlendirilebilmesi CD38 ekspresyonunun diğer belirteçlerden üstün yanıdır. Standardizasyon sağlandığında iyi bir prognoz göstergesi olabilir(7,8).

2.4.8. Kemik iliği tutulum paterni

KLL de kemik iliğinde diffüz, interstisyel, noduler, mikst tutulum görülmektedir. Kemik iliğindeki atipik hücre morfolojisi, iri lenfositlerin yada prolenfositlerin varlığı kötü prognozla ilişkilidir. Jahic ve arkadaşları ileri evre hastalarda daha sık diffüz paternin olduğunu, erken evre hastalarda diğer tutulum paternlerin daha sık olduğunu bildirmiştir(8,9). Diffüz kemik iliği tutulum paterni bulunan hastaların nondiffüz olanlara göre daha kısa yaşam beklentisi olduğu bilinmektedir(8,9).

2.4.9. Sitogenetik

KLL hastalarında en sık saptanan kromozomal anomaliler 13q14 delesyonu, trizomi 12, 11q22-23 delesyonu ve 17p13 delesyonudur. FISH' in bulunması sonrasında sitogenetik inceleme yapmak daha kolay hale gelmiştir. Metafaz olmadığında konvansiyonel çalışmalar yapılamamaktadır. Pahalıdırlar ve en az değerlendirilebilen prognoz göstergeleridir. 13q14 delesyonu en sık görülen anomalidir. Sitogenetik anomaliler arasında en iyi prognozlu göstergedir. 13q14 delesyonu olduğunda antiapoptotik gen olan bcl-2 ekspresyonunu regule eden mikro-RNA parçaları oluştuğunu gösteren kanıtlar bulunmaktadır. Muhtemelen bu sayede klonal KLL hücrelerinin apoptozdan kaçışı kontrol altına alınabilmektedir. 12. kromozom üzerinde hücre döngüsünü düzenleyen siklin D2 kodlanmaktadır. Trizomi 12 olan KLL hücrelerine siklin D2 artışı olmaktadır. Bu sayede proliferasyonun artışı söz konusudur. 11q22.3-q23.1 ve ATM bölgesinin de içinde bulunduğu lokus çok sayıda tümör supresör genin kodlanmasını sağlar. Bu gen, DNA hasarı olduğunda onarımı sağlayacak cevabın güçlendirilmesinde, hücre döngüsünden sorumlu p53' ün aktivasyonunda görev alır. 11q22.2 lokusunda fludarabine refrakterliğe neden olan başka mutasyonlar bildirilmiştir. 11q delesyonu olan vakalar daha genç olup ileri Rai evresine sahiptir. Ayrıca yoğun hücre sel hastalık ile ilişkilidir. Bildirilen başka anomaliler de

mevcuttur. Fakat yeterli çalışma olmadığı için henüz deneysel olarak kullanılmaktadırlar. Sık görülen kromozom anomalileri ve ortalama sağkalım ilişkisi Tablo 4’de gösterilmiştir(7,8):

Tablo 4. KLL de sık görülen sitogenetik belirteçler ve özellikleri

Kromozom aberasyonu	Sıklık(%)	Ortalama sağkalım(ay)	Ortalama tedavisiz sağkalım(ay)	İlgili gen
17q13 del	10	32	9	p53
11q22-23del	15-20	13	13	ATM(?)
Trizomi 12	15-30	114	33	
13q14 del	40-60	133	92	Bilinmiyor miR15a miR16-1

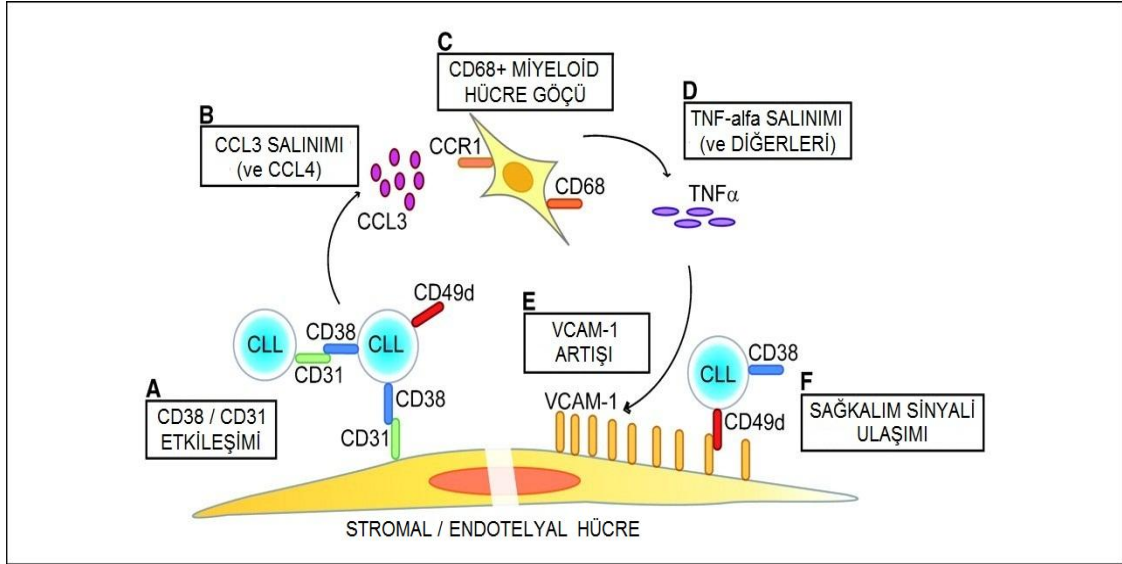
2.5. KLL ve CCL3

Eskiden makrofaj inflamatuvar protein-1 α olarak bilinen C-C motif ligand 3, C-C kemokin ailesinin bir üyesidir. 8-10 kDa ağırlığındadır ve protein yapıdadır. CCL3, öncelikle hücre adezyonundan ve hücre göçünden sorumludur. Ayrıca makrofaj, monosit, T lenfosit, doğal katil hücresi, dendritik hücre, eozinofil ve mast hücresi için kemotaktik işleve sahiptir. CCL3, inflamasyon işlemine katılır, kök hücre proliferasyonunu engeller. Potent bir osteoklast aktivatörüdür. CCL3, normalde stromal ve hematopoietik hücreler tarafından üretilir(10,11,12).

KLL patogenezindeki ve BcR sinyali üzerindeki faaliyetleri sayesinde önemli role sahip CCL3 kemokini, aslında T hücre kemokinlerinden biridir. CCL3, T hücrelerini inflamasyonun bulunduğu yada immun cevabın gerçekleşeceği ortama çeken güçlü kemoatraktan özelliktedir. Bu işlevini KLL de gerçekleştirir(2).

Zucchetto ve arkadaşları, CD38+CD49d+ KLL hücreleri ile CD38-CD49d- KLL hücrelerinde gen ekspresyon profil çalışmaları ile CCL3 ve CCL4 düzeylerini karşılaştırdılar. Kötü prognozlu CD38+CD49d+ grupta CCL3 ve CCL4 ekspresyonu daha yüksek olduğunu tespit ettiler. Kemokin düzeyi yüksek grupta VCAM-1 miktarı

ve kemik iliğindeki CD68+ makrofaj infiltrasyonu daha fazla idi. Zucchetto ve arkadaşları, kemik iliği ve sekonder lenfoid organlarda gerçekleşen mikroçevre etkileşiminin; KLL hücrelerinin hayatta kalmasına, hastalığın ilerlemesine ve tedaviye direnç gelişmesine yol açtığı sonucuna vardılar(10).



Şekil 1: CCL3'ün KLL patogenezindeki yeri*

*Cancer Research, 2009, CD38/CD31, the CLL3 and CCL4 Chemokines, and CD49d/Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Are Interchained by Sequential Events Sustaining Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Survival 'dan uyarlanmıştır.

Burger ve arkadaşları, oluşturdukları hücre kültüründe önce CD19+ KLL hücrelerini ZAP70 pozitif ve negatif olarak ikiye ayırdılar. ZAP70 pozitif vakaların daha fazla CCL3, CCL4 ekspres ettiklerini gördüler. Ardından CD68+ nerselike hücrelerini ortama ilave ettiler. Oluşan ortak kültürde B hücre olgunlaşma antijenlerinin, CCL3 ve CCL4 kemokinlerinin daha fazla ekspres edildiğini saptadılar. Bu bulgularla KLL patogenezinde stromal hücrelerinin aktif rol oynadığı gösterildi. Bu sayede KLL hücrelerinin sağkalımında, mikroçevrenin katkısına dikkat çekilmiş oldu. Aynı çalışmada ortama Syk inhibitörü olan R406 ilave edilerek B hücre reseptörü bloke edildi. Sonuç olarak CCL3 ve CCL4 düzeylerinde azalma oldu. Ortamdan R406 uzaklaştırıldı. Bu kezde B hücre sinyalinin katkısını görmek için ortak kültüre anti-IgM eklendi. BcR sinyali sağlandığında ortak kültürde CCL3 ve CCL4 düzeylerinde artış saptandı. BcR sinyali taklit edilen ortamda apoptozun daha az olduğu görüldü. Bu şekilde CCL3 ve CCL4 bulunan ortamda apoptozdan kaçışın daha fazla olduğu görüşüne varıldı(11).

Terpos ve arkadaşları, Waldenström makroglobulinemisi olan hastaların kemik iliği biyopsilerini immunhistokimyasal olarak incelediler. CCL3 ekspresyonunun bu vakalarda yüksek olduğunu buldular. CCL3'ün ön planda osteoklastik aktiviteden sorumlu olduğu sonucuna ulaştılar. Bu molekülü hedef alan tedavilerin, kemik hastalığı ile giden plazma hücre diskrazileri için ümit vaadedebileceğini öne sürdüler(12).

Sivina ve arkadaşları tarafından CCL3 plazma seviyesi ile KLL progresyonunun korele olduğu bulunmuştur. 351 KLL hastasının tanı aldığı ELISA yöntemi ile plazma CCL3, CCL4 düzeyleri ölçüldü. CCL3 ve CCL4 değerleri; Rai evresi, sitogenetik, IgVH mutasyon durumu, CD38, ZAP70, β 2- mikroglobulin değeri ve LDH seviyesi ile karşılaştırıldı. İleri evre hastalıkta, mutasyonsuz IgVH durumunda, CD38 pozitif ve ZAP70 pozitif vakalarda CCL3 düzeyinin daha yüksek bulunduğu ve yüksek CCL3 değerinin kötü prognoza yolaçtığı görüldü. Ayrıca ≥ 4 mg/L β 2-mikroglobulin olduğunda ve yüksek riskli sitogenetik varlığında CCL3 düzeyi yüksek saptandı. Yüksek CCL3 ve CCL4 seviyesinde tedaviye kadar geçen sürenin daha kısa olduğu tespit edildi(13).

Yakın zamanda ise Jan ve arkadaşları, IgVH mutasyonu bulunan CD38 pozitif KLL hastalarının sitokin düzeylerine baktılar. Hastaları CL1, CL2, CL3 olarak sitokin gruplarına ayırdılar ve aralarındaki ilişkiyi incelediler. CCL3, CL1 sitokin grubundaydı. Sitokinlerin beraber değerlendirildiğinde prognoz hakkında daha net bilgi verebileceğini söylediler. KLL grubunda sağlıklı gruba oranla CCL3 düzeyinidaha yüksek saptadılar ve CCL3 düzeyinin tedaviye kadar geçen süre ile ters korele olduğunu gösterdiler. Yüksek CCL3 değeri varken tedaviye kadar geçen süre daha kısa saptandı(14).

3. YÖNTEM VE GEREÇLER

3.1. YÖNTEM

3.1.1. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

Bu çalışmaya İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Polikliniği'nde KLL tanısı ile izlenen gönüllü hastalar dahil edildi. Kontrol grubuna ise Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları kliniklerinde farklı nedenler ile yatan hastalar dahil edildi.

3.1.2. Kontrol Grubu için Çalışmadan Dışlanma Kriterleri

- Onkolojik hastalığı olanlar
- Kollajen doku hastalığı olanlar
- Hematolojik hastalığı olanlar kontrol grubuna alınmadı.

Kontrol grubu oluştururken hasta grubuna benzer yaş aralığına, cinsiyet varlığına ve ek hastalığı olup olmadığına dikkat edildi.

3.1.3. Çalışmanın İşleyişi

Hasta grubunun verileri Hematoloji takip dosyasından ve hastane kayıt sisteminden elde edildi. Kontrol grubunun verileri yatış dosyasından ve hastane kayıt sisteminden elde edildi.

Hastaların KLL tanısı, National Cancer Institute (NCI) destekli uluslararası KLL çalışma grubu (IWCLL) tarafından 2008 yılında hazırlanan tanı kriterlerine uygun olarak yeniden güncellendi. Hasta grubu için yaş, cinsiyet, tanı yaşı, Rai evresi, Modifiye Rai evresi, Binet evresi, β 2-mikroglobulin değeri, LDH değeri, lenfosit sayısı, organomegali varlığı, CD38 düzeyi, ZAP70 varlığı, kemik iliği tutulum paterni, plazma CCL3 düzeyi, del17p varlığı kaydedildi. Hastaların ayrıca izlem esnasında tedavi alıp almadığı, tedavi endikasyonu, tanıdan tedaviye kadar geçen süre, sağkalımları, toplam takip süresi kaydedildi.

Kontrol grubunun sadece yaş, cinsiyet, plazma CCL3 düzeyi, LDH düzeyi ve lenfosit sayısı ve sağkalım durumu kaydedildi.

Plazma biriktirme işlemi Mayıs 2012-Ocak 2013 arasında yapıldı. Her iki koldaki bireylerden 2 ml kan örneği EDTA'lı tüpe alındı ve bekletilmeden santrifüj edildi. Elde edilen plazma örnekleri -80°C derin dondurucuda analiz zamanına kadar depolandı. Örneklerde plazma CCL3/MIP-1 α analizleri İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda ELISA yöntemi ile yapıldı. Elde edilen değerler bilgisayar ortamına kaydedildi ve değerlerin tamamının kaydedilmesi sonrasında ortalama standart sapma ve standart hata değerleri hesaplanarak, istatistiksel analizleri gerçekleştirildi.

β 2-mikroglobulin, LDH değerleri Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fikret Biyal Merkez Laboratuvarı'na ait olup standardize idi. CD38 verileri Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Orhan Ulutin Laboratuvarı'na ait olup akış sitometrisi ile elde edilmişti. CD38 pozitifliği için kesim değeri % 30 olarak alınmıştır. ZAP70 sonuçları ise Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Labortauvarı'na ait olup immunhistokimyasal olarak tespit edilmişti. Ocak 2013' ten sonra kan kabulü yapılmadı. Her iki grup Mayıs 2014'e kadar izlendi. En kısa izlem süresi 15 ayken, en uzun izlem süresi 24 aydı, hastalar ortalama 18 ay izlendi. İzlem sonunda sağ ve kaybedilen olgular kaydedildi.

3.1.3.1. Plazma CCL3/MIP-1 α analizi

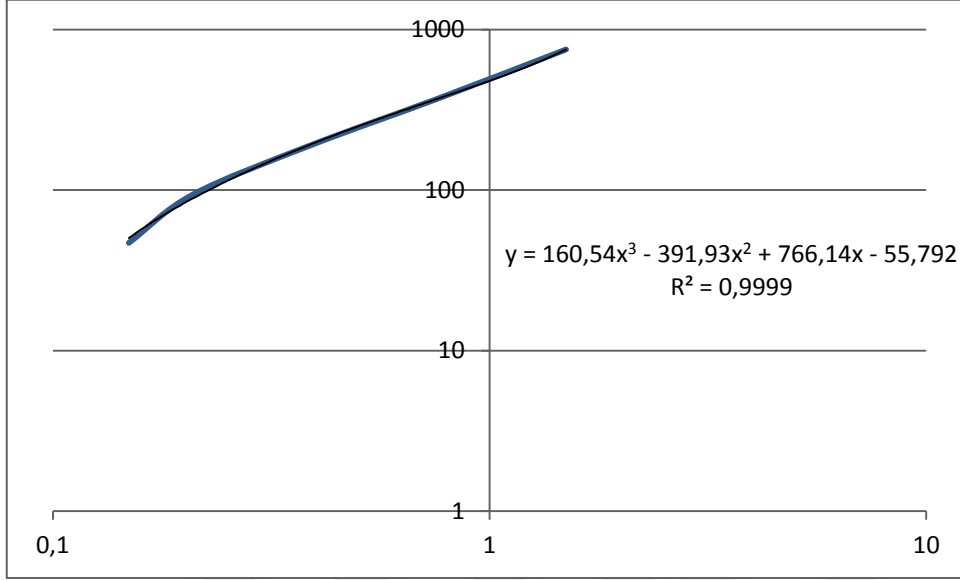
Plazma CCL3/MIP-1 α düzeylerinin belirlenmesinde sandviç ELISA prensibine dayanan ticari kit (R&D Systems Immunoassay Kit, Cat. No: DMA00) kullanıldı.

3.1.3.2. Prensip

Spesifik CCL3/MIP-1 α monoklonal antikorları ile kaplı plaka kuyucuklarına örnekler ve standartlar pipetlenir. Birinci inkübasyon sırasında standartlar ve örnekler kuyularda kaplı bulunan monoklonal antikorlar ve biyotin bağlı antikorlar (ikinci antikor) ile reaksiyona girer. Yıkama işlemi ile bağlanmayan moleküller uzaklaştırılır. CCL3/MIP-1 α 'e spesifik streptavidin peroksidaz (HRP) ile işaretlenen biyotinli monoklonal antikorlar eklenir. Eklenen bu antikorlar ikinci inkübasyon süresinde kuyucuklara sabitlenen antikorlar tarafından bağlanan CCL3/MIP-1 α moleküllerine bağlanarak dört üyeli sandviç modeli oluşturur. Yıkama işleminden sonra substrat çözeltisi eklenir. Oluşan rengin absorbansı 450 nm'de ölçülerek örneklerdeki CCL3/MIP-1 α konsantrasyonları standart eğrisi yardımıyla hesaplanır.

3.1.3.3. Hesaplama

Standart konsantrasyonları x eksenine, standartlara ait absorbanslar ise y eksenine yerleştirilerek dört parametre lojistik fonksiyon eğrisi şeklinde standart eğrisi çizildi. Örneklerin konsantrasyonları standart eğrisinden pg/ml olarak hesaplandı.



Grafik 1. CCL3/MIP-1α standart eğrisi

3.1.4. İstatistik

Elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows versiyon 17 bilgisayar programında hazırlanan forma kaydedilerek analiz edildi. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistikler (ortalama, standart sapma) parametrik test koşullarını sağlayamadığından gruplar arasındaki karşılaştırmalar için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Prognozu etkileyen faktörlerin birbiri ile ilişkisini incelemek için Pearson, Spearman analiz yöntemi kullanıldı. Testin duyarlılığını ve özgüllüğünü ortaya koymak için ROC analizi yapıldı. Logistik regresyon ile bağımsız faktör olup olmadığı araştırıldı. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

3.2. GEREÇLER

Çalışmada CCL3 düzeyinin ölçümü için Human CCL3/MIP-1α ELISA kiti (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) kiti kullanıldı. Ayrıca örneklerin hazırlanması, santrifüj edilmesi, saklanması, okunması için kullanılan alet ve gereçler aşağıda belirtilmiştir:

Santrifüj (Bifuge Stratos Heraeus Instruments)

- Soğutmalı Santrifüj (Christ II KS)
- Ependorf Santrifüjü (Hettich Mikro 200R)
- Etiv (Biyomed FN 500)
- Derin dondurucu (-800C RUA Instruments)
- pH-metre (pH-meter CG840 Schott)
- Vortex (Girdap Elektromag)
- Elektronik tartı (Schimadzu, Libror AEU–210)
- Mikro ELİSA okuyucusu (Bio-Tek, ELx800)
- Mikro ELİSA yıkayıcısı (Bio-Tek, ELx50)

Otomatik pipetler ve pipet uçları, pastör pipetler, santrifüj tüpleri, deney tüpleri, kapaklı tüpler, balon joje, cam kapsül, ependorf, vb. malzemeler.

4. BULGULAR

Çalışmamıza Mayıs 2012- Mayıs 2014 tarihleri arasında İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Polikliniği' nde kayıtlı, KLL tanısı olarak izlenen toplam 99 KLL hastası ve Mayıs 2012- Ocak 2013 tarihleri arasında çalışma kriterlerine uygun olarak hastenemizde yatan hastalardan 25 kontrol alınmıştır. Hasta grubunun bazı verileri geriye dönük elde edilmiştir.

Hastaların kan alındıktan sonra ortalama takip süresi 18 aydı. En kısa takip süresi 15 ayken en uzun takip süresi 24 aydı. Hastaların 37' si kadın(% 37,4), 62' si erkek(%62,6) , Erkek/ Kadın oranı 1,67 olarak saptandı. Kontrol grubunun 7' si kadın(%28), 18'i erkek(%72) saptandı. Hasta ve kontrol grubunun özellikleri Tablo 5'de verilmiştir:

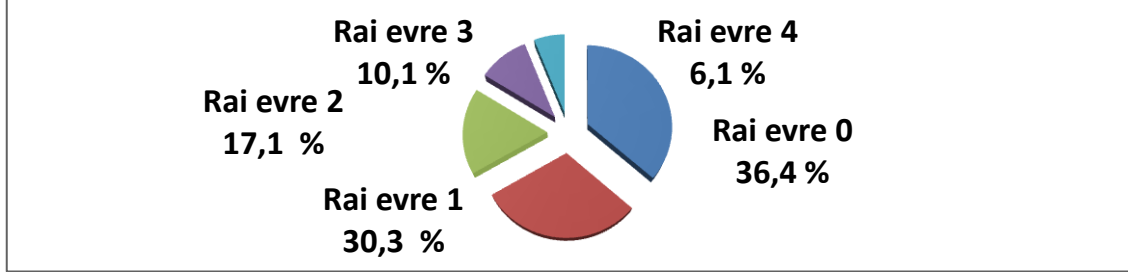
Tablo 5. Hasta ve kontrol grubunun özellikleri

Özellikler	Hasta n:99	Kontrol n:25	p	
Yaş(yıl)	62,69±10,51	67,92±12,28	0,04	
Cinsiyet	Kadın(%)	37 (%37,4)	7 (%28)	–
	Erkek(%)	62 (%62,6)	18 (%72)	–
Lenfosit sayısı(mm ³)	54404,49±89837,57	1968,80±1094,27	0,000	
LDH* (IU/ DL)	406,74±173,52	380,12±113,06	0,5	
CCL3* (pg/ml)	Kadın	82,24±48,76	26,76±6,48	0,001
	Erkek	71,52±43,22	28,24±10,81	0,000

*LDH:Laktat dehidrojenaz, CCL3:C-C motif ligand 3

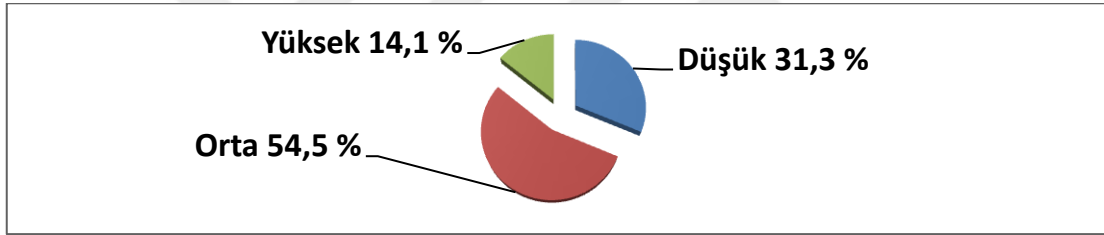
Hastaların yaş ortalaması 62,69±10,51 (37-87) idi. Kontrol grubu yaş ortalaması 67,92±12,28 (44-84) idi (p=0,04).Hastaların tanı yaşı ortalaması 58,89±10,00 (36-84) arasında idi.

Hastalar Rai evresine göre sınıflandırıldığında; 30 hasta(%30,3) Evre 0, 36 hasta(%36,4) Evre 1, 17 hasta(%17,2) Evre 2, 10 hasta(%10,1) Evre 3, 6 hasta(%6,1) Evre 4 hastalığa sahipti. Hastaların Rai evresine göre dağılımı Şekil 2’de verilmiştir:



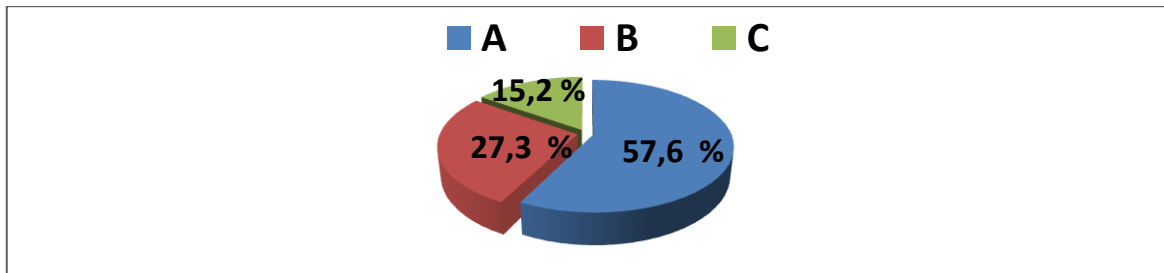
Şekil 2. Hastaların Rai evresine göre dağılımı

Modifiye Rai evresine göre; 31 hasta düşük riskli(%31,3), 54 hasta orta riskli (%54,5), 14 hasta yüksek riskli(%14,1) saptandı. Modifiye Rai evresine göre hasta dağılımı Şekil3’te verilmiştir:



Şekil 3. Hastaların Modifiye Rai evresine göre dağılımı

Binet evrelemesi ile bakıldığında hastaların 57’si Evre A(%57,6), 27’si Evre B(%27,3), 15’i Evre C(%15,2) olarak tespit edildi. Hastaların Binet evresine göre dağılımı Şekil 4’te gösterilmiştir:



Şekil 4. Hastaların Binet evresine göre dağılımı

Hastaların plazma CLL3 ortalaması $74,62 \pm 44,60$ pg/ml iken kontrol grubu plazma CCL3 ortalaması $27,83 \pm 9,68$ pg/ml bulundu. Hasta grubun plazma CCL3 düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edildi($p=0.001$).Cinsiyete göre incelendiğinde hem

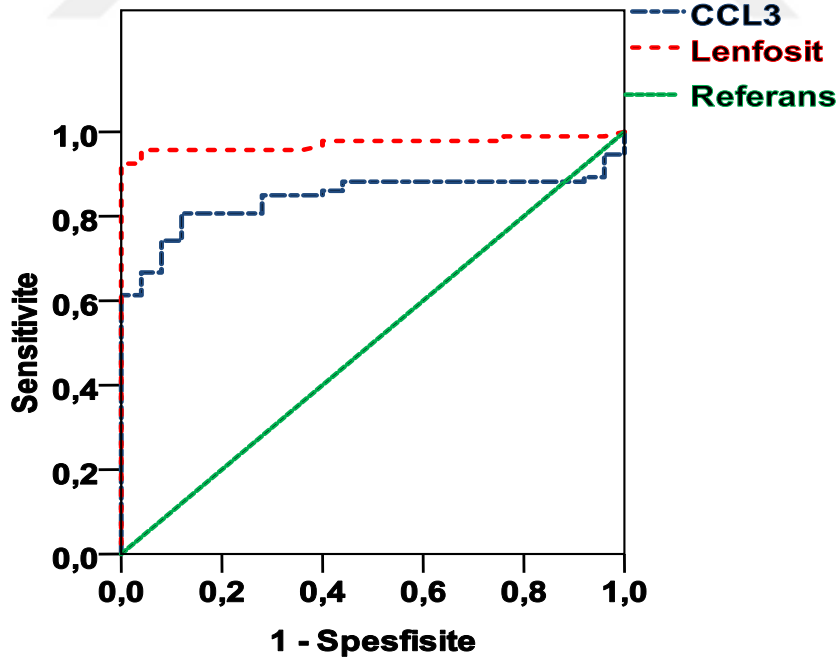
kadın hem erkek CCL3 düzeyi hasta grubunda anlamlı olarak yüksek tespit edildi (sırasıyla; $p=0,000$, $p=0,001$). Hasta grubu kadın ve erkek plazma CCL3 ortalamaları arasında fark tespit edilmedi($p=0,6$).

Hasta ve kontrol grubu arasında plazma CCL3 düzeyi, lenfosit sayısı kullanılarak KLL tanısında uygulanabilirliği açısından Roc analizi ve Roc eğrisi Tablo 6’da ve Şekil 5’te verilmiştir:

Tablo 6. KLL tanısı Roc analizi

	Duyarlılık(%)	Özgüllük(%)	AUC	Kesim Değeri	p
CCL3	80	80	0,843	35,85	0,000
Lenfosit sayısı	95	96	0,972	3915,00	0,000

ROC eğrisi



Şekil 5. KLL tanısı Roc eğrisi

Hasta grubunun prognostik belirteçler esas alındığında ortalama plazma CCL3 düzeyleri Tablo 7’ de belirtilmiştir:

Tablo 7.Hasta grubu plazma CCL3 düzeyi ile prognoz göstergelerinin özellikleri

Grup	n	Ortalama(pg/ml)	p
ZAP70*			
Pozitif	21	86,18±51,76	0,2
Negatif	15	68,18±45,38	
CD38			
Pozitif	9	88,25±54,60	0,6
Negatif	55	75,98±40,87	
FISH			
Del17+	8	78,40±39,73	0,7
Del17p-	43	86,03±50,81	
Kemik iliği tutulum paterni			
Diffüz	13	89,48±38,11	0,1
Non-diffüz	51	77,82±44,39	
Splenomegali			
Var	26	87,49±48,39	0,1
Yok	71	69,91±42,84	

*ZAP70:Zeta zincir ilişkili protein-70

Plazma CCL3 düzeyleri, ZAP70 pozitif ve negatif vakalar ikiye ayrılarak karşılaştırıldı. ZAP70 pozitif olgu grubunda plazma CCL3 ortalaması 86,18±51,76 pg/ml iken ZAP70 negatif olgu grubunda plazma CCL3 ortalaması 68,18±45,38 pg/ml bulundu(p=0,2).

Hastalar del17p pozitif ve negatif vakalar olmak üzere ikiye ayrılarak plazma CCL3 düzeyleri ile karşılaştırıldı. Del17p pozitif vakaların plazma CCL3 ortalaması $78,40 \pm 39,73$ pg/ml iken del17p negatif vakaların plazma CCL3 ortalaması $86,03 \pm 50,31$ pg/ml bulundu ($p=0,7$).

Olgular splenomegali varlığı veya yokluğuna göre iki gruba ayrılarak bakıldığında; splenomegali olanlarda plazma CCL3 ortalaması $87,49 \pm 48,39$ pg/ml, splenomegali olmayanlarda $69,91 \pm 42,84$ pg/ml saptandı ($p=0,1$).

CD38 pozitif ve negatif vakalar iki grupta karşılaştırıldığında; CD38 pozitif olanlarda plazma CCL3 ortalaması $88,25 \pm 54,60$ pg/ml, CD38 negatif olanlarda CCL3 ortalaması $75,98 \pm 40,87$ pg/ml saptandı ($p=0,6$).

Kemik iliği tutulum paternine göre diffüz ve non-diffüz tutulum olarak ikiye ayrılarak karşılaştırıldığında; diffüz tutulumu olanlarda ortalama plazma CCL3 $89,43 \pm 38,11$ pg/ml, non-diffüz tutulumu olanlarda ortalama $77,82 \pm 44,39$ pg/ml saptandı ($p=0,1$).

Hastalar geriye dönük takip edildiği süre içinde tedavi gereksinimi açısından incelendi. Toplam 59 hasta (%59,6) tedavi almıştı. İzlem süresi içinde ise 12 hasta (%12,1) tedavi almıştı. Tedavi ihtiyacı olanların tedavi gerekçelerine bakıldı. 6 ayı nedenle tedavi aldıkları saptandı. B semptomu nedeniyle 2 hasta (%3,28), sitopeni nedeniyle 6 hasta (%10,1), artmış lenfosit doubling time nedeniyle 18 hasta (%30,5), ileri evre hastalık nedeniyle 23 hasta (%38,9) tedavi almıştı. Geri kalan 10 hastada sırasıyla 1 hasta (%1,6) hemolitik anemi, 1 hasta (%1,6) doku tutulumu, 8 hasta (%13,5) yoğun hücrel hastalık nedeniyle tedavi almıştı.

Hasta grubunda tedavi alan ve almayanlar arasında CCL3 ilişkisi Tablo 8'de gösterilmiştir:

Tablo 8. Hasta grubu tedavi gereksinimi ile CCL3 ilişkisi

Grup	N	Ortalama(pg/ml)	Standart Sapma	p
Tedavi almayanlar	40	68,16	$\pm 42,26$	
Tedavi alanlar	59	80,74	$\pm 47,19$	<0,2

Hasta grubunda bulunan olgular için kan alımı takip süresinin başlangıç tarihi olarak alındı. Takip süresi sonunda sağ kalım durumları incelendi. Kaybedilen ve sağ olgular olarak kaydedildi.

Hasta grubunun sağkalım ile plazma CCL3 ilişkisi Tablo 9’da gösterilmiştir:

Tablo 9. Hasta grubu sağ kalım ile plazma CCL3 ilişkisi

Grup	N	Ortalama(pg/ml)	Standart sapma	p
Hasta ex	6	124,80	±64,59	p=0,047
sağ	93	73,35	±42,45	

Tedaviye kadar geçen süre ile plazma CCL3 düzeyi arasında korelasyon saptanmadı. Fakat plazma CCL3 düzeyi ile sağ kalım arasında ters yönde ilişki tespit edildi($r=-0,201$, $p=0,046$). Plazma CCL3 düzeyi yükseldikçe ölüm oranının arttığı görüldü. Plazma CCL3 düzeyi ile lenfosit sayısı, Rai evresi, Modifiye Rai evresi, Binet evresi, LDH, β 2-MG, CD38, ZAP70, splenomegali, kemik iliği tutulum paterni arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmadı.

Plazma CCL3 düzeyinin; sağ kalıma etkisinin tanı yaşından, LDH düzeyinden ve β 2-mikroglobulininden daha üstün olduğu tespit edildi. Tablo 10’da lojistik regresyon analizi verilmiştir:

Tablo 10. Plazma CCL3 düzeyi-sağkalım lojistik regresyon analizi

	OR	p	Güven aralığı
Tanı yaşı	1,027	0,6	0,924-1,142
β 2- mikroglobulin	0,999	0,02	0,999-1,000
LDH*	1,001	0,76	0,994-1,008
CCL3**	1,001	0,01	0,940-0,993

*LDH: Laktat dehidrojenaz, **CCL3: C-C motif ligand 3

Plazma CCL3 düzeyi için Roc analizi ile kesim değeri elde edildi. Olgular plazma CCL3 düzeyi düşük ve yüksek olarak ikiye ayrıldı(kesim değeri: 35,85 pg/ml olarak alınmıştır).LDH düzeyi, β 2-mikroglobulin düzeyi, splenomegali ile ilişkisi incelendi. Plazma CCL3 düzeyi yüksek olan grupta splenomegalinin daha fazla olduğu

görüldü(p=0,025). Plazma CCL3 düzeyi yüksek olan grupta β 2-mikroglobulin düzeyinin yüksek olduğu görüldü(p=0,02).

Olgular plazma CCL3 düzeyine göre yüksek ve düşük olanlar olarak gruplandırıldığında; yüksek plazma CCL3 düzeyi ile splenomegali arasında pozitif yönde ilişki (r=0,229, p=0,024), yüksek plazma CCL3 düzeyi ile β 2-mikroglobulin arasında pozitif yönde ilişki (r=0,220, p=0,042) saptandı. Yüksek plazma CCL3 grubu ile prognoz göstergeleri arasındaki ilişki tablo 11’de gösterilmiştir:

Tablo 11. Plazma CCL3 (>35,85 pg/ml) düzeyi ile diğer prognoz göstergeleri arasındaki korelasyon tablosu

Grup	N	r	p
Rai evresi	99	0,1	0,1
Binet evresi	99	0,1	0,06
Modifiye Rai evresi	99	0,06	0,5
LDH	94	0,1	0,1
B2-MG	86	0,22	0,042
CD38(pozitif/negatif)	64	0,05	0,6
ZAP70(pozitif/negatif)	36	0,1	0,3
Splenomegali(var/yok)	97	0,22	0,024
TTGS*	97	-0,25	0,06
Sağkalım	99	-0,12	0,2

*TTGS:Tanıdan tedaviye kadar geçen süre

Yüksek CCL3 düzeyi ile Binet evrelemesi arasında istatistiksel anlamlı olmayan pozitif yönde ilişki(r=0,06, p=0,06), yüksek CCL3 düzeyi ile tanıdan tedaviye kadar geçen süre arasında istatistiksel anlamlı olmayan negatif yönde ilişki(r=-0,25, p= 0,065) saptandı. Ayrıca sağ kalımla plazma CCL3 düzeyi yüksek grup arasında da istatistiksel anlamlı olmayan ters yönde ilişki saptandı(r=-0,12, p=0,2).

5. TARTIŞMA

Yıllardır KLL hastaları için prognoz göstergesi olan ve olabilecek yeni belirteçler araştırılmaktadır. Fakat gerek yaygın kullanılan gerek yeni belirteçlerin kendilerine özgü problemleri mevcuttur. Bu nedenle daha yaygın kullanılacak, prognozu ve sağ kalımı öngörebilecek, tedavi cevabını tahmin ettirebilecek ve hatta tedavi stratejisinde hedef olabilecek KLL' ye özgün belirteç arayışı sürmektedir.

Evreleme sistemleri laboratuvar desteği olmadan ve pahalı ileri tetkiklerle desteklenmeden hastalık seyrini tahmin etmeyi sağlayabilir. Ancak hastaların tedaviye vereceği cevabı öngöremiyor olması, hastalıkta progresyon gelişip gelişmeyeceğine dair bilgi veremiyor olması dezavantajlarından(7).

LDH, sık kullanılan nonspesifik özellikte bir belirteçtir. Kan alım sürecinden dahi etkilenen düzeyleri nedeniyle aslında bir hayli dezavantajlı konumdadır. Yoğun kütleli hastalık ve yüksek tümör yükünde, Richter transformasyonunda yüksek seyreden bir belirteçtir. Ucuz bir yöntemdir(7,8).

β 2-mikroglobulin, sıkça kullanılan belirteçlerden biri olmakla beraber birçok B hücre malignitesinde, lenfadenomegali varlığı ile giden birçok hastalıkta düzeyi yükselmektedir. En bilindik dezavantajı ile β 2-mikroglobulin düzeyi kronik böbrek yetersizliği tablosundan etkilenmektedir. Delgado ve ark.'nın çalışmasında GFR'ye göre düzenlemiş β 2-mikroglobulin düzeyinin tedavisiz sağ kalımı göstermede daha iyi belirteç olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle β 2-mikroglobulin düzeyi GFR ile valide edilerek kullanılması daha doğru sonuçlar verebilir(7,8,19).

ZAP70 ekspresyonu hastalığın seyrinden ve kortikosteroid tedavisinden etkilenmektedir. Bu yüzden prognozla ilişkisi süreç içinde farklılıklar gösterebilir. Real-time PZR veya immunhistokimyasal olarak bakıldığı için elde edilmesi zordur ve yüksek maliyet getirir(7,8).

CD38 ekspresyonunun yüksekliği kötü prognozla ilişkilidir. Hala standardize edilememesi ve pahalı yöntemlerle belirlenmesi yaygın kullanımını engellemektedir(7,8).

Sitogenetik çalışmaların pahalı olması, teknik ekip gerektirmesi ve sonucun geç elde edilmesi nedeniyle bazı kliniklerde uygulanabilirliğini sınırlamaktadır(7,8).

KLL tanısı akış sitometrisi ile elde edilmiş vakalar için kemik iliği tutulum paterni görmek amacıyla yapılacak kemik iliği biyopsisi fazla girişimsel bulunabilir. Bu yüzden tercih edilmeyebilir. Ayrıca tanı için gerekli olmadığından rutin uygulanmamaktadır.

Son yapılan çalışmalar, kronik lenfositik lösemide BcR sinyalinin, mikroçevre desteğinin patogeneze ne denli önemli roller oynadığını ortaya koymuştur. Özellikle BcR sinyal yolağı üzerinden hem proliferasyonu uyaran hem apoptozu baskılayan sitokinlerden CCL3, KLL hücrelerinin sağkalımında etkindir. Bu sitokin KLL ve DBBHL hastalarında yüksek seviyelerde olduğu saptanmıştır(11,13).

Çalışmamızda, KLL hastalarında plazma CCL3 düzeyinin hastalık seyrini gösterip gösteremeyeceğini ve kullanılan diğer prognostik göstergelerle ilişkisini ortaya koymak amaçlandı. 99 KLL hastasının ve 25 kontrolün plazma CCL3 düzeyine bakıldı. Önce hasta ve kontrol grubu arasında plazma CCL3 düzeyleri karşılaştırıldı. Ardından hasta grubunun Rai evresi, Modifiye Rai evresi, Binet evresi, β 2-mikroglobulin değeri, LDH değeri, splenomegali varlığı, CD38 varlığı, ZAP70 varlığı, kemik iliği tutulum paterni, del17p varlığı ile plazma CCL3 düzeyi karşılaştırıldı.

Çalışmamızda KLL cinsiyet dağılımı topluma benzer olarak bulunmuştur. Tanı yaş ortalaması ise daha düşük saptanmıştır.

Sivina ve ark.'nın yaptığı çalışmada CCL3 düzeyi düşük ve yüksek olarak ikiye ayrıldığında; yüksek CCL3 seviyeleri ile ileri Rai evresi, ZAP70 pozitifliği, CD38 pozitifliği, $4 \text{ mg/L} \geq \beta$ 2-mikroglobulin düzeyi, yüksek riskli sitogenetik ile güçlü ilişki saptanmıştır(13). Bizim çalışmamızda da CCL3 düzeyi yüksek olgularda β 2-mikroglobulin düzeyinin daha yüksek olduğu saptandı.

Çalışmamızda plazma CCL3 ile diğer prognoz belirteçleri arasında ilişki saptanmamasını yeterli sayı ve benzer dağılımda verilerin olmaması ile ilişkilendirdik.

Sivina ve ark.'nın çalışmasında β 2-mikroglobulin yüksek ve düşük grup olarak ikiye ayrılırken 4 mg/L kesim değeri kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda olgular β 2-mikroglobulin düzeyinin bir kesim değeri üzerinden ikiye ayrılmamıştır. Ayrıca hastalarda KBY olup olmadığı belli değildir. Sivina ve ark.'nın çalışmasında ZAP70 değerlendirilmesi akış sitometrisi ile bakılmış ve kantitatif veriler elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise ZAP70 pozitif ve negatif ayrımı immunhistokimyasal olarak değerlendirilmiştir olduğundan sadece kantitatif sonuçlara göre ayırım yapılmıştır. CD38

değerlerinin zaman içinde değişim gösterdiği bilinen bir gerçektir. Çalışmamıza alınan vakaların bir kısmı tedavi almamış iken bir kısmı tedavi almış veya hala tedavi alan durumundadır. Bu nedenle CD38 değerleri tam anlamıyla gerçeği yansıtmayabilir. Tüm bu nedenlerin çalışma sonuçlarının değişmesine katkıda bulunmuş olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda hasta grubunda kadın ve erkek plazma CCL3 düzeyinde farklılık bulunmamıştır. Plazma CCL3 düzeyinin, cinsiyetler arasında fark olup olmadığı henüz bilinmemektedir.

Sağ kalım açısından bakıldığında; sağ kalan ve kaybedilen olgular arasında plazma CCL3 düzeyi açısından güçlü ilişkiye işaret eden farklılık tespit edilmiştir. Plazma CCL3 düzeyi yükseldikçe ölüm oranı artmaktadır. Ayrıca ölümler daha çok ileri evre hastalarda ve tedaviye dirençli vakalarda olduğu dikkati çekmiştir.

Diffüz kemik iliği tutulumunda hastalığın daha agresif gittiği bilinmektedir(7,8). Kemik iliği tutulum paterni diffüz olanlarda plazma CCL3 düzeyi daha yüksek olduğu istatistiksel anlamsız görülmüştür. Fakat diffüz tutulum paterni sadece 13 vakada mevcuttur. Kemik iliği tutulum paterni ile CCL3 düzeyi arasındaki ilişkiyi netleştirmek için daha türdeş gruplarla yapılacak çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Çalışmamızda hastaların farklı tedavi rejimleri alması nedeniyle tedavi sonuçları ile plazma CCL3 düzeyleri karşılaştırılamamıştır. Tedavi alan grupta plazma CCL3 düzeyleri istatistiksel anlamsız daha yüksek bulunmuştur. Fakat CCL3 için kan alım işlemi hastaların bir kısmından tedavi aldıktan sonra yapılmıştı. Bu açıdan çalışmanın kesitsel veri sunduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Ancak yine de tedavi almış vakaların plazma CCL3 düzeylerinin daha yüksek olduğu, evrelerinin ileri olduğu, bir kısmının ikinci hatta üçüncü tedavi ihtiyacı olduğu göze çarpmıştır. Bu nedenle geriye dönük de olsa yüksek plazma CCL3 düzeyine sahip vakaların daha kötü seyrettiği farkedilmiştir. Kan alımı sonrası tedavi ihtiyacı olan hastaların da plazma CCL3 düzeyi incelenmiştir. Bu vakaların plazma CCL3 düzeyleri de yüksek bulunmuştur. Ancak az sayıda oldukları ve takip süresi kısa olduğu için istatistiksel anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Zira hastaların evrelerinde ilerleme olup olmayacağını, tedavi ihtiyacının olup olmayacağını görmek için daha uzun süre izlenmeye ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda plazma CCL3 düzeyinin tek başına sağ kalıma etkisinin, β 2-mikroglobulinden ve LDH' den daha fazla olduğu gösterilmiştir. Daha önce buaçıdan yapılmış başka çalışma olmaması nedeniyle bu bulgu oldukça önemlidir.

Sivina ve ark.'nın çalışmasıyla hemen hemen eş zamanlı BcR üzerinden etki eden PCI-32765(Bruton tipi kinaz inhibitörü), R406(dalak tipi tirozin kinaz inhibitörü) hayvan çalışmaları yayınlandı. Hedef molekül BcR olmakla beraber KLL hücresi viabilitesinin göstergeleri olarak robust kabul edilen CCL3 ve CCL4 seçildi. Her iki çalışmada da ortama BcR sinyalini bloke eden TKİ konulduğunda CCL3 ve CCL4 düzeyinin azaldığı saptandı. PCI-32765 hayvan çalışmasında, deneye katılan hayvanların masif lenfositozu, organomegalileri ve lenfadenomegalileri mevcuttu. PCI-32765 etkisi ile iki hafta sonunda mevcut bulgularının gerilediği saptandı. Ayrıca kilo kaybının durduğu ve letarjik görünümün kaybolduğu görüldü. Çalışmanın sonunda, CCL3' ün ve CCL4' ün BcR aktivasyonunu gösterebilecek biyobelirteçler olabileceği, BcR sinyal yolağını hedefleyen tedavilerde alınan cevabı gösterebileceği sonucuna ulaşıldı(13,14). R406 çalışmasında ise KLL hücrelerinin sağ kalımını, göçünü ve yuvalanmasını sağlayan CCL3/CCL4 gibi sitokinlerin salınımını parakrin etkilerle gerçekleştiren mikroçevre desteğinin; artan R406 miktarlarıyla durdurulduğu görüldü(15). Burger' in yaptığı derlemede, artık prognostik belirteçlerin tedavi cevabını öngörmek için kullanılabileceği sunulmuştur. BcR ilişkili risk faktörlerinin; hangi hastaların tedaviye cevap verebileceğinin tanınmasında, cevap değerlendirilmesinde yardımcı olabileceği belirtilmiştir(17). Yapılan son çalışmalar BcR aktivasyonunu gösteren CCL3 sitokininin tedaviye cevabı tahmin ettirebileceğine dair sonuçlar sunmaktadır. Fakat tedavi ihtiyacını öngörmek için kullanılabileceği yönünde veri bulunmamaktadır. Halbuki poliklinikte karşılaşılan asemptomatik KLL vakalarının cevap beklediği sorulardan biri ileride tedavi alıp almayacağıdır. Kaldı ki tedavi ihtiyacını doğru olarak belirleyebildiğinde, doğru tahmin ettirici CCL3 düzeyi için alınacak kesim değerinin ne olacağı merak konusu olacaktır(13,15,16,17).

Çalışmamızda, KLL hasta grubunun kontrol grubundan daha yüksek plazma CCL3 düzeyine sahip olduğunu saptadık. Fakat tanıda kullanılıp kullanılmayacağı açısından yapılmış çalışma olmadığını gördük. Bu yönüyle yapılan analizde lenfosit sayısı kadar tanısız olabileceği görülmüştür. Ancak diğer B hücre malignitelerinde de yüksek düzeyleri saptandığı için KLL'ye özgü olmaması tanısız niteliği azaltabileceğini

düşünmekteyiz(12,13). Yine de tanısal niteliğini arttırabilecek ek çalışmaların yapılmasından yanayız.

Plazma CCL3 düzeyinin hastalık şiddetini belirlemede yol gösterici olabilir. Henüz hangi düzeyin hastalık şiddetini belirlediği net değildir. Bu açıdan daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu sayede hastalık şiddetinin belirlenmesine, hatta KLL için prognoz skorlama sistemlerinin oluşturulmasına katkı da sağlanabilir. Hedefe yönelik tedavilerin takibinde ayrıntılı bazı moleküler analizlerin yerini alabilecek bir belirteç olabileceği için önem arz etmektedir. Bu yönüyle KML'de bcr-abl düzeyi takibine benzer şekilde tedavi cevabının değerlendirilmesinde kullanılabilir.

Sivina ve arkadaşlarının ortaya koyduğu CCL3 sitokininin robust özellikte oluşu, ucuz oluşu nedeniyle yaygın kullanılabilmesi, teknik uzman ve donanım gerektirmeden ELISA ile ölçülebiliyor olması, sonucun belirtilmesi için uzun zaman gerekmemesi molekülün öne çıkmasını sağlamıştır(13). Bizim çalışmamız da plazma CCL3 düzeyinin önemli bir prognoz göstergesi olduğunu saptadığımız için önceki çalışmayı desteklemekteydi. Ancak özellikle tek başına sağkalıma etkisinin LDH düzeyinden ve β 2-mikroglobulin düzeyinden daha fazla olduğunu saptanması yönüyle çalışmamız daha üstün niteliktedir.

6. ÖZET

KLL, erişkinde en sık görülen hematolojik malignitelerden biridir. Sıklıkla, ileri yaş grubunda rastlantısal olarak tanı konulmaktadır. Hastaların büyük grubu asemptomatiktir ve uzun yıllar tedavi almadan izlenir.

KLL tanısı konulduktan sonra karşılaşılan en sık soru ne zaman tedavi verileceği ve hastalığın nasıl gideceğidir. Hala bu sorulara yeterli cevap verecek prognoz belirteçleri arayışı sürmektedir.

Çalışmamıza İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Hematoloji Polikliniği' nde izlenen 99 KLL hastası ve 25 kontrol alındı. Hasta grubunun yaşı, cinsiyeti, Rai evresine, modifiye Rai evresi, Binet evresi, lenfosit sayısı, LDH düzeyi, β 2-mikroglobulin düzeyi, CD38 yüzdesi, ZAP70 durumu, del17p durumu, kemik iliği tutulum paterni, splenomegali varlığı, plazma CCL3 düzeyine bakıldı. Kontrol grubunun yaşı, cinsiyet, lenfosit, plazma CCL3 düzeyine bakıldı. Öncelikle hasta ve kontrol grubu arasında plazma CCL3 düzeyleri karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak hasta grubunda yüksek saptandı.

Gruplar ortalama 18 ay izlendi. Hasta grubu CCL3 düzeyi düşük ve yüksek olmak üzere iki gruba ayrıldı. Yüksek plazma CCL3 düzeyi ile β 2-mikroglobulin düzeyi ve splenomegali arasında pozitif korelasyon bulundu. Plazma CCL3 düzeyi yükseldikçe sağkalımın azaldığı istatistiksel olarak tespit edildi. Plazma CCL3 düzeyi takip süresi içinde kaybedilen KLL hastalarında daha yüksek bulundu.

Yaş, LDH, β 2-mikroglobulin ile karşılaştırıldığında plazma CCL3 düzeyinin sağkalımda en etkili faktör olduğu bulundu. Tedavi alan ve almayan grup arasında plazma CCL3 düzeyi arasında farklılık bulunmadı.

Plazma CCL3 düzeyi; KLL hastalarında sağ kalım ile korele olup önemli bir prognostik belirteçtir. Henüz hangi düzeyin hastalık şiddetini belirlediği net değildir. Daha sonraki çalışmalarla ortaya konabilecek kesim değerleri; hastalık şiddetinin belirlenmesini ve KLL için prognostik gösterge olarak kullanılmasını sağlayabilir.

7. SUMMARY

CLL is one of the most common hematologic malignancies in adulthood. Regarding to need for treatment and survival, prognostic markers are important.

99 CLL patients followed at Istanbul University Cerrahpasa Medical Faculty Hematology Department and 25 control cases were included in the study. Age, sex, RAI/ modified RAI/ Binet stages, lymphocyte count, LDH, β -2 microglobulin level, CD38 expression levels, ZAP70 expression, deletion 17p, bone marrow involvement pattern, state of splenomegaly and plasma CCL3/MIPI- α levels of CLL patients were recorded. Age, sex, lymphocyte count and plasma CCL3/MIPI- α levels of cases in the control group were recorded. CCL3/MIPI- α levels were found higher in the CLL group at a statistically significant level.

The median follow-up time was 18 months. CLL patients were divided into two subgroups defined by low and high CCL3/MIPI- α levels. High plasma CCL3/MIPI- α levels; β -2 microglobulin levels and presence of splenomegaly were found to be positively correlated. It was statistically determined that overall survival decreased with increased CCL3 levels. Patients lost during the follow-up period had higher plasma CCL3/MIPI- α levels.

Comparison with age, LDH, and β -2 microglobulin revealed that CCL3/MIPI- α level was more correlated with overall survival. There was not any difference in CCL3 levels between the treated and not treated patients.

In conclusion plasma level of CCL3 is correlated with overall survival. The exact level of this chemokine in defining disease course is not determined yet. Further studies are warranted to confirm cut-off values of this chemokine and to make it one of the prognostic markers in CLL.

8. KAYNAKLAR

1. Türk Hematoloji Derneği, Kronik Lenfositik Lösemi Tanı ve Tedavi Kılavuzu, 2012
2. Davids M S, Burger J A, Cell trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia, Open J Hematology, 2012
3. Ramsey A D, Justo M R, Chronic lymphocytic leukaemia- the role of the microenvironment pathogenesis and therapy, British Journal of Haematology. 2013:162,15-24
4. Hallek M, Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment , American Journal of Hematology, 2013
5. Zhang S, Kipps T J, The pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia, Review in Advance, 2013
6. Oscier D, Dearden C, Erem E, et al., Guidelines on the diagnosis, investigation and management of chronic lymphocytic leukaemia, British Journal of Haematology. 2012:159, 541-564
7. Rosenquist R, et al., Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand?, Leukemia& Lymphoma, 2013
8. Bockstaele F V, et al., Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: A comprehensive review, Blood Reviews, 2009
9. Jahic A, et al., Prognostic significance of bone-marrow pattern and immunophenotypic score in B-chronic lymphocytic leukemia at diagnosis, Med Arh., 2011
10. Zuchetto A, et a., CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines and CD49d/Vascular Cell Adhesion Molecule-1 are interchained by sequential events sustaining Chronic Lymphocytic Leukemia cell survival, Cancer Research, 2009

11. Burger J A, et al., High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurse-like cell cocultures and after BCR stimulation, *Blood*, 2009
12. Terpos E, et al., Expression of CCL3 by neoplastic cells in patients with Waldenström's Macroglobulinemia: An immunohistochemical study in bone marrow biopsies of 67 patients, *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, 2011
13. Sivina M, et al., CCL3(MIP-1 α) plasma levels and the risk for disease progression in chronic lymphocytic leukemia, *Blood*, 2011
14. Yan XJ, Identification of outcome-correlated cytokine clusters in chronic lymphocytic leukemia, *Blood*, 2011
15. Quiroga M P, et al., B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406, *Blood*, 2009
16. Burger J A, et al., The times they are a-changin': prognostic markers in the new era of BCR-targeting therapies for CLL, *Expert Opinion on Medical Diagnostics*, 2012
17. Ponader S, et al., The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia survival and tissue homing in vitro and in vivo, *Blood*, 2012