



**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**TÜYLÜ HÜCRELİ LÖSEMİ HASTALARINDA
KALRETİKÜLİN GEN MUTASYONU
SAPTANMASI VE PROGNOZLA İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Salih SUBARİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet YILMAZ**

ARALIK-2015

**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**TÜYLÜ HÜCRELİ LÖSEMİ HASTALARINDA
KALRETİKÜLİN GEN MUTASYONU
SAPTANMASI VE PROGNOZLA İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Salih SUBARİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet YILMAZ**

ARALIK-2015

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından TF. 15. 36 proje numarası ile desteklenmiştir.

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**TÜYLÜ HÜCRELİ LÖSEMİ HASTALARINDA KALRETİKÜLİN GEN
MUTASYONU SAPTANMASI VE PROGNOZLA İLİŞKİSİ**

Dr. Salih SUBARİ

28.12.2015

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

(İmza).....

Prof. Dr. Levent ELBEYLİ

Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

(İmza).....

Prof. Dr. Ahmet Mesut ONAT

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

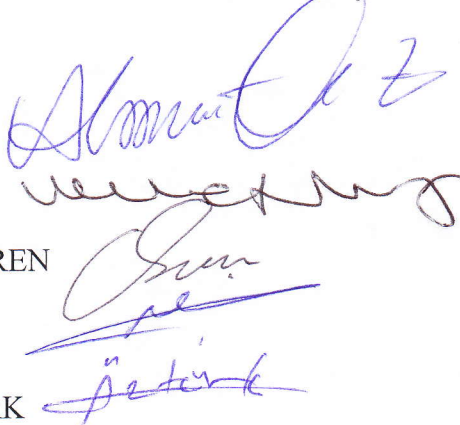
(İmza).....

Prof. Dr. Mehmet YILMAZ

Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof. Dr. Ahmet Mesut ONAT
2. Prof. Dr. Mehmet YILMAZ
3. Yrd. Doç. Dr. Orçun ALTUNÖREN
4. Prof. Dr. Mesut ÖZKAYA
5. Doç. Dr. Zeynel Abidin ÖZTÜRK



I. ÖNSÖZ

Bu çalışmada bana destek veren, tez çalışmamı yöneten, bilgisi, tecrübesi, sınırsız sevgi, hoşgörü ve sabrıyla eğitimimde büyük emeği olan, değerli hocam Prof. Dr. Mehmet Yılmaz'a, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet Mesut Onat başta olmak üzere asistanlık eğitimim süresince desteklerini eksik etmeyen, eğitimim ve yetişmemde büyük katkıları olan bütün bilim dallarındaki değerli öğretim üyeleri hocalarıma sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda bilgi ve kişisel desteğini esirgemeyen Prof. Dr. İbrahim Sarı'ya ve Doç. Dr. Serdar Öztuzcu'ya teşekkür ederim.

Hiçbir zaman desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Dr. Mehmet Türker'e, ihtisasım boyunca yanımda olan tüm hekim arkadaşlarıma, İç Hastalıkları Anabilim Dalı bünyesinde büyük özveriyle çalışan hemşire ve personellere teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan eşim Cevher Subari ile yetişmemde ve bu günlere gelmemde büyük emeği olan annem ve babam Medine-Behcet Subari'ye sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Salih SUBARİ

Gaziantep 2015

II. İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	V
SİMGE VE KISALTMALAR.....	VI
TABLO LİSTESİ.....	VII
ŞEKİL LİSTESİ.....	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tüylü Hücreli Lösemi.....	3
2.1.1. Hücre Orjini ve Hastalığın Etyolojisi.....	3
2.1.2. Klinik Bulgular.....	6
2.1.3. Laboratuvar Bulguları.....	6
2.1.4. Patolojik özellikler.....	7
2.1.4.1. Hücre Morfolojisi	7
2.1.4.2. Kemik iliği aspirasyon ve biyopsi bulguları.....	7
2.1.4.3. Diğer Organ Tutulumları.....	8
2.1.5. Genetik ve İmmunfenotipik Özellikler.....	8
2.1.6. Tedavi.....	9
2.1.6.1. Pürin Analogları.....	9
2.1.6.1.1. Kladribin.....	9
2.1.6.1.2. Pentostatin.....	10
2.1.6.2. İnterferon Alfa.....	11
2.1.6.3. Splenektomi	11
2.1.6.4. Monoklonal Antikorlar.....	12
2.2. Kalretikülin ve Kalretikülin Gen Mutasyonları.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Hastalara ait özellikler.....	17
3.2. Laboratuvar parametreleri.....	17
3.3. Tedavi ve remisyon kriterleri.....	18
3.4. Örneklerin incelenmesi.....	18

3.4.1. Parafin Dokusundan DNA izolasyonu.....	18
3.4.2. Hedef Bölgelerin Çoğaltımı İçin Primer Dizaynı.....	19
3.4.3. Hedef Bölgelerin PCR Reaksiyonu ile Çoğaltımı.....	20
3.4.4. DNA Dizi Analizleri İle Mutasyonların Tespiti.....	22
3.5. İstatistiksel Analiz.....	23
4. BULGULAR.....	24
5. TARTIŞMA.....	31
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	35
7. KAYNAKLAR.....	36
8. EKLER	46



III. ÖZET

TÜYLÜ HÜCRELİ LÖSEMİ HASTALARINDA KALRETİKÜLİN GEN MUTASYONU SAPTANMASI VE PROGNOZLA İLİŞKİSİ

Dr. Salih SUBARİ

Uzmanlık tezi, İç Hastalıkları A.D

Tez danışmanı: Prof. Dr. Mehmet YILMAZ

Aralık 2015

Amaç: Tüylü hücreli lösemi nadir görülen bir lenfoproliferatif hastalıktır. Hastalığın patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. Hücre içi birçok homeostaz mekanizmasında rolü olan kalretikülin proteininin, kalretikülin gen mutasyonu sonucunda patolojik olarak sentezlendiği ve JAK/STAT sinyal yolağında aktivasyona neden olduğu anlaşılmıştır. Kalretikülin mutasyonu sonucu çeşitli homeostaz bozuklukları ve kanserlerin ortaya çıktığı görülmüştür. Bu çalışmadaki amacımız Tüylü hücreli lösemi hastalığında Kalretikülin gen mutasyon varlığını belirlemektir. Buna ek olarak hastalığın bazı klinik verilerini ve bunların prognoz ile ilişkisini değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve yöntem: Çalışmamızda tek merkezli olarak 2005-2015 yılları arasında Tüylü hücreli lösemi tanısı almış 33 hastanın kemik iliği biyopsi doku örnekleri kullanılmıştır. Hastaların klinik ve laboratuvar bulguları retrospektif olarak tarandı. Genetik materyalin izolasyonu sonrası PCR yöntemi ve gen sekans analizi ile Kalretikülin gen mutasyon varlığı değerlendirildi. Hastalara ait yaş, cinsiyet, laboratuvar parametreleri ve hayatta kalma süresi istatistiksel yöntem ile değerlendirildi.

Bulgular: 33 hastanın 21 'inde gen sekans analizi yapılabildi ve hiçbirinde mutasyon tespit edilemedi. Hastaların 26' sı (%78.8) erkek olup ortalama yaşı 55.3 ± 13.3 olarak saptandı. Kladribin tedavisi uygulanan yirmi üç hastanın 13'ü (%56.5) tam remisyona, 3'ü (%13) parsiyel remisyona ulaşabildi. Monositopenisi olmayanlarda splenomegali görülme sıklığı anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.05$). Tedavi uygulanan ($H=23$) ve uygulanmayan ($H=10$) hastalar arası sağ kalımda fark olduğu saptandı ($p=0.001$). Tedavi uygulanan hastaların sağ kalım süreleri almayanlara göre belirgin olarak uzundu. Dahası, remisyona giren hastaların median Hgb değeri (10.1 g/dL), remisyona girmeyen hastaların median Hgb değerinden (8.5 g/dL) daha yüksek olduğu tespit edilmiş olup aralarında istatistik olarak anlamlı fark vardı ($p=0.047$).

Sonuç: Bu çalışma literatürde Tüylü Hücreli Lösemide kalretikülin gen mutasyonu ile ilgili olarak yapılan ilk çalışmadır. Çalışmamızda hastalığın klinik, histopatolojik ve prognostik özellikleriyle ilgili önemli bilgiler elde edilmiş, monositopenisi olmayanlarda dalak büyüklüğünün varlığı ve remisyona giren hastalarda hemoglobinin değerlerinin yüksekliğinin girmeyenlere göre yüksekliği anlamlı bulunmuştur. Bu sonuç Tüylü Hücreli Lösemi hastalarında tedavi zamanlaması açısından önemli bir bulgu olabilir.

Anahtar Kelimeler: Tüylü Hücreli Lösemi, Kalretikülin, Monositopeni, Splenomegali

IV. ABSTRACT

CALRETICULIN GENE MUTATION IN HAIRY CELL LEUKEMIA AND RELATIONSHIP WITH PROGNOSIS

Dr. Salih SUBARİ

Residency Thesis, Department of Internal Medicine

Supervisor: Dr. Mehmet YILMAZ

December 2015

Objective: Hairy cell leukemia is a rare lymphoproliferative disorder. The pathogenesis of the disease is not completely understood. Calreticulin protein plays a role on homeostasis mechanism in the cell. It is synthesized as a result of pathological calreticulin gene mutation and JAK / STAT signaling pathway was found to cause activation. Calreticulin mutations were found to occur as a result of various homeostatic disorders and cancer. The aim of this study was to determine the presence of calreticulin gene mutation in hairy cell leukemia; additionally we aimed to assess clinical data of disease and relationship with their prognosis.

Materials and Methods: In this single-center study, bone marrow biopsy tissue samples of 33 hairy cell leukemia patients whom were diagnosed between 2005-2015 were used. Some clinical and laboratory findings of the patients were studied as retrospectively. Following the isolation of genetic material and gene sequence analysis by PCR, mutations were investigated for calreticulin. Patient's age, gender, laboratory parameters and survival time were evaluated by statistical methods.

Results: Of the 33 patient samples, 21 gene sequencing could be performed and calreticulin gene mutation was not detected in any. 26 patients (78.8%) were male and mean age was determined as 55.3 ± 13.3 years. Of the 33 patients, 23 received cladribine treatment with 13 (%56.5) patients achieved complete remission and 3 (%13) achieved partial remission. When assessed the presence of splenomegaly and monocytopenia; splenomegaly was significantly higher in patients without monocytopenia ($p=0.05$). There was survival differences between treated (23 patients) and untreated (10 patients) patient group ($p=0.001$). The patients who treated had significantly longer overall survival compared to those untreated patients. Furthermore, median hemoglobin level was higher in remission group compared to non remission group as 10.1 g/dl vs 8.5 g/dL respectively and there was a statistically significant difference between them ($p=0.047$).

Conclusion: This is the first study carried out regarding calreticulin gene mutation in Hairy Cell Leukemia in the literature. In our study, we obtained important information about the disease clinic, histopathology and prognostic features. As a result, spleen sizes were larger in patients with who had non-monocytopenia and hemoglobin levels were higher in remission group. This result may be an important finding in terms of timing of treatment in patients with Hairy Cell Leukemia.

Keywords: Hairy cell leukemia, Calreticulin, Monocytopenia, Splenomegaly

V. SİMGE VE KISALTMALAR

ADA	: Adenozin Deaminaz
ANAX 1	: Annexin A1
BCR	: B hücre reseptörü
BRAF	: v-Raf fare sarkomu viral onkogen homoloğu B1
CALR	: Kalretikülin Geni
CNX	: Calnexin
CRT	: Kalretikülin
ER	: Endoplazmik Retikulum
ET	: Esansiyel Trombositoz
GC	: Post germinal
HCL	: Tüylü Hücreli Lösemi
HCL-v	: Tüylü Hücreli Lösemi varyant
HGB	: Hemoglobin
HLA	: İnsan Lökosit Antigen
JAK-2	: Janus-Kinase 2
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LYM	: Lenfosit
MON	: Monosit
MCL	: Mantle Cell Lenfoma
MPL	: Trombopoetin reseptör gen
NEU	: Nötrofil
PCA-1	: Plazma Hücre Markır 1
PLT	: Trombosit
PMF	: Primer Myelofibrozis
SMZL	: Splenik Marjinal Zon Lenfoma
TGF-B	: Transforming Growth Factor
TR/PR	: Tam remisyon/ Parsiyel remisyon
WBC	: Beyaz küre
2-CdA	: Kladribin

VI. TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Hedef bölgelerin çoğaltımı için hazırlanan PCR karışımı oranları	21
Tablo 2. Otomatik DNA dizileme için hazırlanan PCR karışımı oranları (Sekans PCR).....	23
Tablo 3. Hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri.....	26
Tablo 4. Gruplar arası sağkalım analizi.....	27
Tablo 5. İlk basamak tedavi sonrası remisyona giren ve girmeyen hastalar arası farklar.....	30

VII. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil-1: Tüm hastaların genel sağkalım grafiği (%).....	25
Şekil-2: Tedavi durumuna göre sağkalım farkı (Kaplan-Meier Yöntemi).....	28
Şekil-3: Relapssız sağ kalım (RFS) grafiği (Kaplan-Meier Yöntemi).....	29



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüylü hücreli lösemi (Hairy cell lösemi, HCL) hastalığı ilk olarak 1958’de Bouroncle ve arkadaşları [1] tarafından tanımlanmıştır. Tüylü hücreli lösemi hücreleri çevresel kanda, kemik iliğinde ve dalak kırmızı pulpada tespit edilebilen, geniş stoplazmalı ve saç-tüy benzeri çıkıntıları olan küçük olgun lenfoid hücrelerin birikimi ile karakterize sık rastlanmayan kronik B hücreli lenfoproliferatif bir hastalıktır. Hücrelerin bu görüntüsü hastalığa karakteristik özelliğini vermektedir. Hastalık tipik olarak splenemogeli ile birlikte eritrosit, trombosit, granülosit ve monosit sayısında değişken düzeyde azalma ile sonuçlanır. Hücre sayılarında azalma ve pansitopeni çeşitli sebeplere bağlı olmakla birlikte temel olarak tümör hücrelerinde artışın diğer olgun hücre elementlerini azaltmasıyla meydana gelir. Sonuç olarak anemi, kanama, ve enfeksiyon riskinde artışı içeren çeşitli sistemik tablolarla sonuçlanır.

Son 25 yıl içinde hastalığın temeli, gidişatı ve tedavisi üzerine çalışmalar giderek artı. Son çalışmalar, aynı zamanda, hastalık patogenezinin sorumlu moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına yol açtı. Ama yinede hastalığın insidans ve prevalansının az olması nedeniyle hastalığın patogenezi ve etyolojisi hakkında bilgilerimiz yeterli değildir. Hastalık günümüzde halen gizemini korumaktadır.

Kalretikülin (calreticulin, CRT) primer olarak hücrelerin endoplazmik retikulum (ER)’unda lokalize fonksiyonel bir kalsiyum bağlayıcı protein olup, ayrıca nükleus, hücre membranı ve ekstrasellüler matrixte bulunmuştur [2]. Tüm ökaryotik çekirdekli hücrelerin endoplazmik retikulumunda tespit edilmiştir. Bu protein ilk olarak Kanada’da bulunan MacLennan’s laboratuvarında sarkoplazmik retikulumdan izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. Kalretikülinin C-terminal bölgesi hem kalsiyum taşıyıcı bir alan hem de ER’u tutan bir motif içerir. Kalretikülin’in normal fonksiyonu ER dahilinde yeni sentezlenen glikoproteinlerin uygun şekilde katlanmasının temini ve kalsiyum homeostazının modulasyonunu sağlamayı içerir [3-4]. Son yirmi yılda, Kalretikülinin ER içinde ve dışında, hemen hemen tüm normal veya patolojik hücre fonksiyonlarına

karıştığı anlaşıldı. Hücrelerin sağlıklı olması, hastalıklı olması veya hücrelerin ölümünü düzenlemesi rol aldığı önemli durumlardır.

Kalretikülin geni (CALR, calregülin) kromozom 19p 13.2 de lokalize olup dokuzuncu exonda bulunur. Bu genin mutasyonu Esansiyel Trombositoz (ET) ve Primer myelofibrozis (PMF) hastalarında görülür ve kalsiyum bağlayıcı özelliğini kaybetmiş, ER retansiyon alanları içeren protein görülür. Henüz tam açıklanmamış bir mekanizma olarak bu mutasyonlar CRT proteininin foksiyonunu değiştirir, hücre serilerinin sitokin-bağımsız büyüme kabiliyeti ve JAK/STAT sinyalinin aktivasyonu ortaya çıkar ki farmakolojik JAK2 inhibisyonuna sensitiftir [5].

Kalretikülin'in hücrelerin önemli kritik aşamalarında etkili olması araştırmacıları bu konunun derinliklerini keşfetmeye yöneltmiştir. Kalretikülin gen mutasyonlarının özellikle myeloproliferatif hastalıklarda ne kadar etkili olduğu ile ilgili güncel çalışmalar mevcuttur. Kalretikülin gen mutasyonları HCL hastalarında henüz araştırılmamış bir konudur. B hücreli bir malignite olan HCL için CALR mutasyonlarının araştırılması ve hastalık gelişimine katkısının ortaya konması, henüz etyolojisi tam olarak açıklanamamış bir hastalık için oldukça değerlidir. Bizde tasarladığımız çalışmamızda HCL hastalarında CALR mutasyonlarının tespit edilmesini hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tüylü Hücreli Lösemi

2.1.1. Hücre Orjini ve Hastalığın Etyolojisi

Tüylü hücreli lösemi hastalığı ilk olarak 1958’de Bouroncle ve arkadaşları [1] tarafından tanımlanmıştır. Hastalığın ismi mononükleer hücre yüzeyinde tüy benzeri çıkıntıların gözlenmesinden türetilmiştir. Tüylü hücreli lösemi, lenfoid malignitelerin sadece %2’sini oluşturan sık rastlanmayan bir malignitedir ve Amerika Birleşik Devletlerin’de yılda 600-800 yeni hastaya tanı konmaktadır (In Swerdlow SH. Campo E. , Harris NL. , et al. editors: WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues, ed 4, Lyon, 2008, International Agency for research on Cancer (IARC)). Tüm lenfoid neoplazmların %1’inden azını oluşturur. Tahmini insidansı milyonda üçtür [6]. Hastalık beyazlarda daha fazla görülür ve erkeklerde sıklığı daha fazladır (E/K oranı 4/1). Genellikle ellili yaşlarda görülmektedir. Ancak, daha yaşlı hastalarda tanı çabalarının yetersizliği ve hastalığın yetersiz bildirilmesi muhtemeldir. Tüylü hücreli lösemi, 20’li-30’lu yaşlarda tanımlanmıştır ancak çocuklarda son derece nadirdir.

Hastalığın etyopatogenezi tam olarak bilinmemektedir. Ancak, araştırmalar bir serin/treonin kinaz olan BRAF’da (RAF’ın izoformu) V600E aktive edici mutasyonunu HCL patogenezinde suçlamıştır. BRAF, serin/treonin kinaz ailesinin bir üyesidir ki hücre proliferasyon ve sağkalımında ileri gelen RAS/RAF/MEK/MAPK sinyal yolağının bir parçası olarak rol oynar. Tüylü hücreli lösemi patogenezinde RAF’ın (BRAF V600E) izoformu olan BRAF’ın aktif nokta mutasyonu sorumlu tutulmuştur [7-9]. Tiacci E. ve ark. HCL hastalarından alınan kan örneklerinde geniş genom sekansı sonrası 123 HCL vakasının tamamında BRAF-V600E mutasyonu saptadı [10]. Bunun aksine, 79 hastanın HCL benzeri hastalıkları olmak üzere 115 non-HCL hastasında BRAF-V600E mutasyonu negatif olarak saptandı [10]. Tiacci E. ve arkadaşlarının [7]

yaptığı başka bir çalışmada, 47 HCL hastasının tamamında BRAF-V600E mutasyonu saptandı, 38'i splenic marjinal zon lenfoma (SMZL) veya sınıflanmamış dalak lenfoma-lösemisi olan hastaları içeren 195 non-HCL periferik B lenfoma veya lösemi hastasında bu mutasyon geniş gen sekans analiziyle saptanamamıştır. Bu fikir doğrultusunda HCL hastalarının BRAF inhibitör tedavisine cevap verdiği bildirilmiştir [11]. Benzen, organofosfat ve diğer çözücüler içeren bileşiklere maruziyet hastalık etyolojisinde suçlansada bu ilişki tam olarak doğrulanamamıştır. Radyasyon, ağaç tozu, tarımsal kimyasallar veya önceki enfeksiyöz mononükleoz maruziyeti de predispozan faktörler olarak ileri sürülmüştür ama direk olarak bu faktörlerin biriyle nedensel bir ilişki saptanamamıştır. Benzer HLA haplotipi olan aile üyelerinde, ailesel vakalar tarif edilmiştir [12-13].

Tüylü hücreli lösemi hücrelerinin kökeni ile ilgili çeşitli tartışmalar mevcuttur. Başlangıçta, monosit/makrofaj sistem hücrelerine morfolojik ve fonksiyonel benzerlikler yüzünden, HCL tümör hücrelerinin retikuloendotelial sistemden transforme edilen bir hücre olabileceği düşünülmüştür. Hastalığın B-hücre kaynaklı olduğunu ilk defa gösteren Korsmeyer SJ. ve arkadaşları [14-15], HCL'de B-hücre reseptör (BCR) immünglobulin genlerinin yeniden düzenlendiğini göstermiştir. Tüylü hücreli lösemi'nin geç faz, aktif hafıza B hücrelerinden ortaya çıktığı varsayılmıştır. Tüylü hücreli lösemi malign hücreleri, sürekli preplazma hücre veya post-germinal (GC) merkez hafıza B hücreleri gibi B hücre gelişiminin geç evreleri ile birlikte [16-17]. Tüylü Hücreli Lösemi'nin post-GC kökeni, HCL hücreleri ile diğer lenfoid neoplazmlar, hem de naif ve hafıza B hücrelerinin gen ekspresyon profili karşılaştırılarak desteklenmektedir [18]. Dahası, hafıza B hücreleriyle karşılaştırıldığında, HCL hücreleri apoptozis, proliferasyon ve DNA metabolizma programında dikkat çekici korunma ama hücre adezyonu ve kemokinlere cevabı kontrol eden genlerin ekspresyonunda anlamlı farka sahipti [18]. Hafıza B-hücre markırı CD27'nin HCL hücrelerinde ekspresyon kaybı, hafıza B hücre orijin hipotezine karşıdır. Ancak, CD27 negatif hafıza B hücreleri insanlarda tarif edilmiştir ve HCL hücrelerinin neoplastik transformasyonunun bir sonucu olarak bu markırı kaybedebileceği düşünülmüştür. Bunlara ek olarak post-GC hücre olduğunu destekleyen çeşitli bulgular vardır. Klonal immünglobulin hafif ve ağır zincir gen düzenlenmesi ve monoklonal yüzey immünglobulin ekspresyonu [15, 19-20], tüm B hücre yüzey antijenlerini (CD19,

CD20 ve CD22) ve bir erken plazma hücre markırını (PCA-1) eksprese etmesine rağmen B hücre gelişiminin erken evre markırları CD10 ve CD21 eksprese etmemesi sayılabilir. Tüylü hücreli lösemi hücreleri CD11c (monosit ve nötrofil), CD25 (aktive T Hücre) ve CD103 (intraepitelyal T Hücreleri) gibi B hücrelerinde sık rastlanmayan yüzey antijenlerini de eksprese eder. Tüylü hücreli lösemi hücreleri, monositik pencerede eksprese edilen CD45'i kuvvetle eksprese eder, ancak bu markır monositlerde tipik olarak saptanmaz. Olgun B hücre antijenleri ve bir veya birden çok ağır zincir ve monotipik hafif zincir eksprese eder (Eşit hasta sayısında kapa ve lamda hafif zincir). Yukarıda da bahsedildiği üzere B hücre ilişkili antijenler CD19, CD20, CD22, FMC7, CD79b'yi eksprese eder ama CD5, CD10 (yaklaşık %10 pozitif) ve CD23 (yaklaşık %20 pozitif) ekspresyon kayıpları vardır. Tüylü hücreli lösemi'yi diğer B hücrelerinden ayırmak için özellikli bir markır yoktur, ancak CD11c, CD123, CD103 hem de IL-2 reseptör alfa subunit (CD25) tipik olarak eksprese edilir.

Çeşitli sitogenetik anormallikler HCL'de raprolandı ama persistan olarak mevcut değildi. Ortak mitojenlere tüylü hücrelerin düşük tepkisi, kemik iliği örneği elde etmenin zorluğu ve hastalığın nadir görülmesi yüzünden az sayıda sitogenetik çalışma bildirilmiştir. Rapor serilerinde, kromozom 1, 2, 5, 6, 11, 14, 19 ve 20 sıklıkla etkilendiği ve başlıca kromozom 5 ve kromozom 14 anormalliğini içerdiği gösterilmiştir. Klonal karyotipik anomaliler yaklaşık olarak 2/3 hastada mevcut olup Kromozom 5 anormallikleri %40, sıklıkla trizomi 5, perisentrik inversiyon, ve band 5q13 içeren interstisyel delesyon mevcuttur [21]. Bunlara ek olarak p53 delesyon ve mutasyonları ile cyclin D1 aşırı ekspresyonları bildirilmiştir. Tüylü hücreli lösemi'de karşılıklı kromozom translokasyonlarının olmaması, hastalığın hafıza B-hücre kökeni ile uyumludur [16]. Bu translokasyonların immunglobulin remodeling mekanizmalarındaki hatalardan kaynaklandığı düşünülmektedir ki hafıza B hücrelerinin bu translokasyonlara kapalı olduğuna inanılır [16].

Tüylü hücreli lösemi, ANAX1 gen (annexin A1) aşırı ekspresyonunu içeren ve diğer B hücreli lenfomalardan farklı olan gen ekspresyon profiline sahiptir [18]. Annexin A1 için immün boyamanın, HCL için çok spesifik olduğu bildirilmiştir [22]. Tüylü hücreli lösemi'yi, SMZL gibi diğer lenfoid neoplazmlardan ve HCL-v'den ayırt etmek için ANAX1 kullanılabilir [9, 22]. Buna ek olarak, Cyclin D1 (CCND1

tarafından kodlanan) sıklıkla eksprese edilir, ancak mantle cell lenfomanın (MCL) aksine bu CCND1 ile ilgili translokasyona sekonder değildir.

2.1.2. Klinik Bulgular

Tüylü hücreli lösemi hastaları splenomegali veya sitopeniler ile ilişkili (örneğin, anemi, trombositopeni, nötropeni, monositopeni) zayıflık, kolay yorulma, değişken şiddetli enfeksiyonlar ve/veya diş eti kanaması, ekimoz, epistaksis, menoraji gibi hemoraji bulguları ile prezente olur. Pansitopeniler muhtemelen multifaktöriyeldir ve hipersplenizm ile kemik iliği infiltrasyonu önemli sebeplerini oluşturur. Monositopeni karakteristik bulgudur. Bu belirti ve bulgular değişik oranlarda saptanır [23-24]. Başka bir sebeple araştırılırken bulunan hastaların oranı yaklaşık olarak %25'tir. Poliarteritis nodoza, lökositoklastik vaskülitler veya diğer otoimmün manifestasyonlarla birlikte görülebilir [25-26]. Fizik muayenede en önde gelen bulgu palpabl splenomegali olup vakaların %80-90'ında ortaya çıkar ve vakaların %25'inde sol kosta kenardan uzaması 8cm den fazladır [23-24]. Splenomegali nedeniyle batında dolgunluk ve rahatsızlık hissi olabilir. Hepatomegali ve lenfadenopati HCL'nin major bulguları değildir ve yaklaşık olarak sırasıyla, %20 ve %10 görülür. Hastaların gece terlemesi ve ateş şikayeti genellikle yoktur. Ateş görülmesi muhtemel süperimpoze enfeksiyonu gösterir. Konstitusyonel olarak halsizlik kilo kaybı saptanabilir. Nadir olarak plevral effüzyon, asit, yumuşak doku infiltrasyonu ve vaskülitik döküntüler saptanabilir. Çok nadir olarak kemik ağrıları tarif edilebilir [27].

2.1.3. Laboratuvar Bulguları

Tüylü hücreli lösemi hastalarının sitopeni bulguları değişkendir. Hastaların %60-80'inde hematokrit düzeyi %20-35, genellikle total beyaz küre (WBC) sayısı 4000/microL altında ve trombosit (PLT) sayısı 20000-100000/microL aralığında saptanır [23-24]. Nötropeni ile birlikte monositopeni siktir ve karakteristiktir. Laktat dehidrogenaz (LDH) genellikle normaldir. Hastaların yaklaşık %10-20'sinde total WBC sayısının 10000/microL üstünde saptandığı lökositoz mevcuttur. Hipergamaglobulinemi ile birlikte anormal karaciğer fonksiyon testleri ve azotemi nadir olarak saptanır.

2.1.4. Patolojik Özellikleri

2.1.4.1. Hücre Morfolojisi

Periferik kanda dolaşan tüylü hücrelerin sayısı %20'nin altındadır. Bununla birlikte tanı alan hastaların periferik kan yaymalarında %90'ında tespit edilir. Tüylü hücreli lösemi hücreleri mononükleer olup normal lenfositin 1-2 katıdır [28]. Tüylü hücreler küçük, orta büyüklükte, oval veya girintili (fasulye şekilli) çekirdeğe sahip, normal B hücrelerine göre az topaklaşan homojen kromatini olan hücrelerdir. Çekirdek sıklıkla ekzantrik pozisyonundadır, ancak santral olabilir. Çekirdek en sık olarak ovoid yapıdadır, ancak yuvarlak, iğsi veya atnalı şeklinde olabilir. Kromatin paterni retiküler veya ağ benzeri görünümde olabilir. Çekirdekçik yoktur veya göze çarpmaz, bol ve soluk mavi stoplazmalı çevresinde saç çıkıntıları olan hücrelerdir. Hücreye adını veren saç-tüy benzeri çıkıntılar en iyi faz kontrast mikroskopide görülür. Saç benzeri çıkıntılar elektron mikroskobu ile kolayca görülür [29-30].

2.1.4.2 Kemik İliği Aspirasyon ve Biyopsi Bulguları

Kemik iliği sıklıkla aspire edilemez (kuru ilik, dry tap). Hastalık tanısı çevresel yayma örnekleri ve terefin biyopsilere dayanılarak konur. Kemik iliği fibrozisi, HCL hücreleri tarafından fibronektin üretimi ve fibroblastlar tarafından ince retikülün liflerin (başlıca tip 3 kollojenden oluşan) birikiminden kaynaklanır [16]. Tüylü hücreli lösemi hücreleri asit fosfatazin izoenzim 5'ini sentezler ki tartarik asit ile tedaviye direnç kazandırır. Fiilen bütün vakalar tartarate-resistant asit fosfataz (TRAP) pozitifdir. DBA44 (Monoklonal HCL-Ab) ve TRAP'ın birlikte ekspresyonunun immunohistokimya analizi, tanıya ulaşmak için son derece özel ve faydalıdır. Periferik kan yaymalarında, ilik aspirat yaymalarında veya kemik iliği biyopsi örneklerinde TRAP aktivitesi HCL tanısı doğrulanmasında eskiden rutin olarak kullanılmaktaydı [31]. Ancak, TRAP teknik olarak zor bir boyamadır ve HCL için sensitiftir. Flow simometri kadar spesifik değildir ki TRAP boyama büyük ölçüde eskimiş bir yöntemdir.

Kemik iliği birçok hastada hipersellülerdir ve tüylü hücre infiltrasyonu diffüz veya interstisyel olabilir [9]. Kemik iliğinin noduler paternde infiltrasyonu diğer B hücreli lenfoproliferatif hastalıkların aksine nadirdir. Hastaların az bir kısmında hiposellüler kemik iliği saptanır.

2.1.4.3. Diğer Organ Tutulumları

Dalak kırmızı pulpa tutulumu ve beyaz pulpa atrofisi değerlendirilebilen bütün vakalarda gösterilebilir. Tüylü hücreli lösemi hücreleriyle çevrili, eritrosit dolu dilate sinüsler görülebilir ve psödosinüs adını alır. Sınırlı karaciğer tutulumu muhtemeldir ve sinüzoide sınırlıdır. Hepatomegali genellikle görülmez. Lenf nodu tutulumu ileri evre hastalık lehinedir (Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC Press, Lyon 2008). Tümör hücreleri değişken olarak interfoliküler ve paraaortik zonları kapsar. Foliküller ve sinüsler tipik olarak korunmuştur.

2.1.5. Genetik ve İmmunfenotipik Özellikler

BRAF mutasyonu birçok HCL vakasında tarif edilmesine rağmen tanı kriterlerine dahil edilebilmesi için sensitivite ve spesifitesini tanımlamaya ihtiyaç vardır. İmmunglobulin değişken bölge gen analizleri, vakaların büyük çoğunluğunda (%85'ten fazla hastada) somatik mutasyonları göstermiştir [32].

Tüylü hücreler CD19, CD20, CD22 ve CD25 içeren pan-B hücre antijenlerini fazlasıyla eksprese eder ve genellikle CD5, CD10, CD21, CD23 ekspresyon kaybı vardır [9, 33]. Cyclin D1, CD123, CD103, CD11c diğer eksprese edilen antijenlerdir. Mukozal lenfosit antijen olan CD103, HCL tanısında sensitif bir markırdır [34]. Diğer pan-B antijenlerine ek olarak CD103 tespit edilmesi, HCL tanısının konmasında fikir vericidir [35]. Myelomonositlerle ilişkili bir markır olan CD11c ve IL-2 reseptör alfa zinciri CD25'in de güçlü olarak ekspresyonu saptanır [33, 36]. Annexin A1 hastaların çoğunda eksprese edilir [9, 22]. Ara sıra, HCL atipik fenotipe sahip olabilir ve CD5 gibi markırları eksprese eder. Bu gibi durumlarda, cyclin D1 immun boyama MCL ihtimalini dışlamak için uygulanabilir.

Hastalığın tanısını koyarken semptomlara ek olarak bahsedilen bulguları saptamak üzere tüm tetkiklerin yapılması gerekmektedir. Kemik iliği aspirasyon ve biyopsisi dışında genellikle organ biyopsisi gerekmez. Splenektomi tanısız amaçlı nadiren uygulanır, ancak tedavi amaçlı uygulanabilmektedir. Diğer B-hücreli lenfoproliferatif hastalıklardan ayrımında tüm bu tetkikler birlikte ele alınmalıdır. Mantle cell lenfoma, splenik marjinal zon lenfoma, Tüylü hücreli lösemi-varyant (HCL-

v), prolenfositik lösemi, kronik lenfositik lösemi (KLL) ve aplastik anemi hastalığının ayırıcı tanısına girer.

2.1.6. Tedavi

Hastaların birçoğuna tedavi başlamadan yıllar önce tanı konulmuştur. Erken tedavi gerekliliği ile ilgili net bir görüş yoktur. Çeşitli bulgu veya semptomlardan sonra tedavi kararı verilir. Bunlar, semptomatik splenomegali/lenfadenopati, konstitusyonel semptomların ilerlemesi, enfeksiyonlar ile mutlak nötrofil $< 1000/\text{microL}$, Hgb konsantrasyonu $<10 \text{ g/dL}$ ile semptomatik anemi ve PLT sayısı $<100000/\text{microL}$ nedeniyle kanamayı içeren ciddi sitopeni tablolarını içerir. Semptomatik HCL hastaları için sitotoksik kemoterapiler, interferon ve splenektomiye içeren tedaviler mevcuttur [37]. Pürin analogları olan kladribin veya pentostatin ilk seçilecek ilaçlardır.

2.1.6.1. Pürin Analogları

Bu tedavi seçeneği hastalarda uzun süreli tam remisyon (TR) neden olduğu için ilk seçilecek ilaçlardır. Pentostatin (2'-deoxycoformycin, 2'-DCF) ve kladribin (2-chlorodeoxyadenosine, 2-CdA), hem bölünmekte olan hem de bölünmüş lenfositler üstüne sitotoksiktir. Tümör yükü veya önceden tedavi alıp almamasına bakılmaksızın her iki ajana eşit ve yüksek oranda TR cevabı vardır [38-39].

2.1.6.1.1 Kladribin

Tüylü hücreli lösemi tedavisinde ilk ve en çok tercih edilen tedavi kladribindir (2-CdA). Kladribinin HCL'deki etkinliği ilk olarak 12 hastayı içeren bir çalışmada 1990 yılında rapor edildi [40]. Bu çalışmada, 12 hasta tek siklus 2-CdA ile tedavi edildi (0,1 mg/kg/gün, 7 günlük devamlı infüzyon) ve tedavinin 8. haftasında 11 hastada tam patolojik cevap elde edildi. 16 haftalık medyan takip süresinde hiçbir hastada tedavi sonrası relaps olmadı ve tedaviyle ilişkili konstitusyonel yan etkiler yaşanmadı [40]. Klorlu pürin halka yapısı yüzünden adenosin deaminaz (ADA) tarafından deaminasyona dayanıklılığı, pentostatine üstünlük sağlar. Lenfositler yüksek oranda deoxycytidine kinase (DCK) enzimine sahiptir. Kladribin bu enzim sayesinde lenfositotoksik formuna fosforile edilir. Sonuçta meydana gelen 2-chlorodeoxyadenosine triphosphate, hem bölünmüş hem de bölünmekte olan lenfositlere sitotoksik etki gösterir [41]. Bölünen hücrelerde 2-CdA, ribonükleotid redüktazı inhibe ederek DNA sentezini bozar ve DNA içine birleşmek için dATP ile

yarışır. Standart tedavi rejimi 7 günlük devamlı intravenöz infüzyondur (0,10 mg/kg/gün) [42-44].

Goodman GR. ve arkadaşlarının [45] yaptığı bir çalışmada, 207 HCL hastası 7 günlük 0.10 mg/kg/gün dozunda sürekli intravenöz infüzyon şeklinde 2-CdA ile tedavi edildi. Tek siklus 2-CdA sonrası 195 (%95) hasta TR ve 11 (%5) hasta parsiyel remisyonu (PR) başardı (genel cevap oranı %100) [45]. Tüm cevap verenler için median cevap süresi 98 aydı [45]. Tek siklus 2-CdA sonrası 76 (%37) hasta relaps oldu ve ilk relapsa kadar geçen süre 42 aydı [45]. Saven A. ve arkadaşlarının [43] 2-CdA tedavisi sonrası HCL hastalarının uzun süreli takibini yaptıkları başka bir çalışmada, değerlendirilebilen 349 hastada, 319 (%91) TR ile 22 (%7) PR oranları elde edildi. Takiplerde genel median cevap süresi 52 aydı [43]. Dört yılda genel sağkalım oranı %95 idi. Her iki çalışmada da relaps olan hastaların 2-CdA ile yeniden başarıyla tedavi edilebileceği belirtilmiştir.

2.1.6.1.2 Pentostatin

Pentostatin, pürin metabolizmasında kritik öneme sahip olan ADA enziminin irreverzibl inhibitörüdür. Bu tedavi sonrası malign hücrelerde biriken deoksiadenozin tripfosfat metabolitinin sitotoksisiteye sebep olduğu düşünülmüştür [46]. Tüylü hücreli lösemi hastalarında yüksek tam cevap oranları ilk olarak bu ilaçla elde edilmişti [47-48]. Çeşitli çalışmalarda farklı uygulama rejimleri önerilmekle birlikte Amerikan Gıda ve İlaç Yönetim birimi (US Food and Drug Administration) en iyi yanıt alınana kadar iki haftada bir 4mg/m² dozunda uygulanmasını önermiştir.

Cassileth PA. ve arkadaşları [49], 50 HCL hastasına 5mg/m²/gün dozunda pentostatinle ardışık 2 gün/2 hafta şeklinde tedavi etmiş ve 32 (%64) TR, 10 (%20) PR elde etmişlerdir. Hastaların çoğu major cevabı altı ay içinde elde etmişlerdir [49].

Daha önce tedavi edilmiş veya edilmemiş hastaların büyük bölümü, ya multiple siklus pentostatin veya tek bir siklus kladribinle uzun süreli remisyonu başarır [50]. Her iki ajanın sonuçları mükemmel olmasına rağmen, kladribinin tek siklus uygulama kolaylığı ve toksisitesinin azlığı cazip avantajlarıdır. Else M. ve arkadaşları [39] pentostatin (188 hasta) ve kladribinle (45 hasta) tedavi edilmiş 233 hastanın 16 yıllık takibini değerlendirdiği bir çalışmada, iki ajanın sonuçları bakımından fark

saptamamışlardır. Genel tam cevap oranı %80 ve median nüks olmadan sağ kalım süresi 16 yıldır [39]. Tedaviye cevapsız (5 hasta) veya relaps olanlardan (79 hasta), 26 hastaya pentostatin ve 58 hastaya kladribin verilmesi sonrası %69 tam cevap ve 11 yıllık nüks olmadan sağkalım elde edilmiştir [39]. Üçüncü basamak tedavi alan hastaların %50'si tam cevap elde etmiş ve nüks olmadan sağkalım 6,5 yıldır [39]. Tam cevabı olanların, tedavi öncesi Hgb>10g/dL ve trombosit>100x10⁹ /L sahip olanlar, daha uzun süreli nüks olmadan sağkalıma sahipti (P < 0.0001) [39].

2.1.6.2. İnterferon Alfa

İnterferon alfa'nın (IFN-alfa) HCL hastalarındaki kesin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Tüylü hücreli lösemide, granülosit koloni stimulan faktör, granülosit makrofaj koloni stimulan faktör, interlökin-3 (IL3), interlökin-6 (IL6) gibi sitokinlerin üretiminde yetersizlik olabilir. Bu tedavi ile sayılan sitokinlerin üretimi artırılabilir [51]. Bir çalışmada, HCL hastalarının mononükleer hücrelerinde sitokinlerin azalmasının, azalmış hematopoezis ile ilişkisi araştırılmıştı [51]. Aynı çalışmada IFN-alfa'nın, sağlıklı donörlerle kıyaslandığında HCL hastalarının periferik mononükleer hücrelerinde IL-6 sekresyonunu indüklediği saptanmıştır [51]. Bu nedenle IFN-alfa, lösemik hücre popülasyonu içinde hematopoietik büyüme faktörlerinin indüksiyonu ile kısmen sonuçlanabilir.

Tedavi 12-18 ay için haftada üç sefer 2 milyon ünite/m² (standart rejim) dozunda uygulanır. IFN-alfa tedavisi alan birçok HCL hastasında, periferik hücre sayımı düzelmesine rağmen gerçek tam remisyon sık değildir. Ratain MJ. ve arkadaşlarının [52] yaptığı bir çalışmada, standart rejimle tedavi edilen 68 hastada %75 oranında yüksek genel cevap oranı elde edilmiş; ancak hastaların %13'ü TR ve %62 oranında çoğunluğu PR'ı başarmıştı (tüm periferik kan sayımlarının normalleşmesi olarak tanımlanan). Hastalarda TR elde etmenin zorluğu nedeniyle IFN-alfa ilk basamak tedavi değildir. Diğer tedavilerle başarısızlık olan hastalara verilebilmektedir.

2.1.6.3. Splenektomi

Splenektomi yapılan 65 hastanın değerlendirildiği bir çalışmada, 27 hasta tüm kan hücre sayılarının düzeldiği TR ve 38 hasta bir veya iki kan hücre sayısının düzeldiği PR'ı başardı [53]. Tüm hastalar için genel sağkalım %68'di ve TR hastaları için %76 ve PR hastaları için %62 idi [53]. Dalakta masif büyüme, ağrı, enfarkt, rüptür ve diğer

tedavilere cevapsızlık splenektomi endikasyonu koydurabilir. Pürin analogları ile tedavi splenektomi ihtiyacını büyük oranda ortadan kaldırmıştır.

2.1.6.4. Monoklonal Antikorlar

CD20, CD22 veya CD25 karşıtı üç monoklonal antikor “rezistan veya relaps HCL” tedavisinde kullanılabilen ajanlardır. Burada bahsedilen rezistan hastalık pürin analogları ile tedaviye cevapsız veya parsiyel cevaplı oluşu olarak tarif edilmektedir. Pürin analogları ile elde edilen yüksek cevap oranları birinci basamak tedavi olarak yerini korumuştur. Bu durumda rezistan hastalık varlığında önerilen tıroapetik seçenek ilk seçilenden farklı bir pürin analogu kullanmaktır. Ancak diğer tedavi seçeneklerine ek olarak monoklonal antikorlarda bir tedavi seçeneği olabilir. Relaps hastalık terimi ise ilk remisyondan sonra hastalığın nüksetmesi anlamını taşır. Else M. ve arkadaşlarının [38] yaptığı bir çalışmada, on yıllık takip sonunda ilk basamakta kladribin veya pentostatin ile tedavi edilmiş hastaların relaps oranları sırasıyla %48 ve %42 olarak saptandı. Aynı çalışmada, hastaların aynı pürin analogu ile tedavi edilmesi veya diğer pürin analogu ile tekrar tedavi edilmesi sonucu etkilemedi (sırasıyla TR, %71 ve %68) [38]. Tam remisyon oranları yüksek olmasına rağmen hastalıksız sağkalım her siklus sonrası kısaldığı görüldü (üç basamakta sırasıyla 14, 7,5 ve 4 yıl) [38]. Relaps olan hastalarda aynı ajanla ikinci siklus tedavinin tekrarlanması yüksek remisyon oranları elde edilmesiyle birlikte tavsiye edilen bir yaklaşımdır [38, 43, 54].

Monoklonal antikorlardan CD20 monoklonal antikorunun HCL hastalarına etkinliği farklı çalışmalarda değerlendirilmiştir. Bir çalışmada ilk basamak kladribinle tedavi edilmiş 24 HCL hastasına 375 mg/m²/hafta intravenöz infüzyonlar şeklinde rituximab tedavisi verilmiş ve 3 hasta (%13) TR ve 3 (%13) PR başarmıştır [55]. Pentostatin veya kladribin ile eş zamanlı (6 hasta) veya ardışık (2 hasta) rituximab tedavisi uygulanan bir çalışmada; tüm hastalar tedaviye cevap vermiş ve 7 hasta (%87.5) bunu TR ile başarmıştı [56]. Bu çalışmayla relaps/refrakter HCL hastalarında pürin analogları ile rituximab kombinasyonun hastalar için güvenli olduğu ve standart tedaviye göre ek yarar sağlayabileceği ileri sürülmüştür [56].

Diğer bir monoklonal antikor anti-CD22 antikordur (BL22). Psödomonas ekzotoksin bağlantılı rekombinant anti CD22 antikorlu bir faz-2 çalışmada, sitopeniler

yüzünden tedavi gereken 36 relaps/refrakter HCL hastasının değerlendirilmiş, tam ve genel cevap oranları (TR+PR) ilk siklustan sonra sırasıyla %25 ve %50, ikinci siklustan sonra %47 ve %72 olarak bildirilmiştir [57]. Bu ajan henüz rutin tedaviye girmemiş olup relaps/refrakter hastalıkta yeni bir tedavi alternatifi olabilir.

Anti CD25 antikor (LMB2) ajanının CD25+ HCL ve diğer hematolojik malignitelerin tedavisinde etkin olduğu gösterilmiştir [58].

2.2. Kalretikülin ve Kalretikülin Gen Mutasyonları

Kalretikülin bütün ökaryot hücrelerin endoplazmik retikulumunda lokalize kalsiyum (Ca^{2+}) bağlayıcı bir şaperondur. İlk defa 1970 yılında Kanada'da bir laboratuvarında sarkoplazmik retikulumdan saflaştırılarak izole edilmiştir [59]. Yüksek kapasitede kalsiyum bağlama özelliği ile bir tampon görevi gördüğü anlaşılmıştır [60-61]. Sonrasında yapılan araştırmalar, ER içinde ve dışında normal hücre regülasyonu ve hücre ölümünü içeren birçok önemli fizyolojik durumda rol aldığını gösterdi. Normal hücre fizyolojisi ve patolojik hücre fonksiyonlarının neredeyse her aşamasında etkisinin olduğu görüldü. Endoplazmik retikulumun mitokondriye Ca^{2+} sağlaması ve bu sayede mitokondriyal ATP sentezi, hücre ölümü, respiratuar zincirde elektron akışı ve Ca^{2+} tamponlamasına etkisinin saptanması, ER'deki Ca^{2+} -binding proteinlere ve glikoprotein formasyonu ile degradasyonundaki rolüne dikkati çevirmiştir.

Başlıca Ca^{2+} bağlayıcı şaperonlar olan CRT ve calnexin (CNX), daha çok N-glikolize proteinlerin doğru katlanmasından sorumludur. Kalretikülin solubl ER proteindir ve serbestçe hareket edebilir. Kalretikülin doğası gereği, birçok glikozile ve non glikozile proteinin katlanma basamaklarında etkili, karmaşık bir proteindir. Fakat CRT, negatif yük nedeniyle bir miktar katyonik protein ve lipitide bağlar. Kalretikülin ile birçok bağlanma karakteristiği ortaya çıkarılmıştır. İlk olarak tercihen hidrofobik proteinlere bağlıdır. Kalretikülin beta-iplik veya alfa-helix potansiyelindeki kısa peptitleri bağlamayı tercih etmez, oysa büyük yapıdaki peptitlerin beta-iplik yapısı tercih edilir. Kalretikülin, beş aminoasitten kısa peptitleri bağlamaz. Aynı zamanda CRT'nin intakt proteinlerin sülfid ve disülfid gruplarıyla da etkileştiği görülmüştür.

Kalretikülin, hem glikoprotein hem de polipeptid spesifik bağlanma alanlarına sahiptir. Globuler bir uç ve uzamış P-domain içerir. Kalretikülin'e glikolize ve non-

glikolize protein bağlanmasına göre P-domainin sırasıyla açık ve kapalı olduğu ileri sürülmüştür [62]. Böylece, glikan bağımlı veya bağımsız etkileşimlerin, oluşan protein katlanmasında CRT tarafından katkı sağlandığı görüldü [62]. Bu etkileşimlerle CRT protein katlanmasına katkıda bulunur.

İnsan vücudunda fizyolojik fagositoz, Ca^{2+} bağımlı bir süreçtir. Nötrofillerde Ca^{2+} artışının önemi bilinmektedir. Örnek olarak, membranda bulunan G-F aktin mobilizasyonunda ve respiratuar burst aktivasyonunda kritik öneme sahiptir. Buna ek olarak intrasellüler fagozomlar Ca^{2+} bağımlı birçok enzime sahiptir. Bu reaksiyonların oluşmasında Ca^{2+} tamponlama görevi üstlenen CRT'nin önemi yadsınamaz.

Bazı tümörlerin hücre yüzeyinde CRT varlığı immunogenik hücre ölümüne destek sağlar. Hücre yüzeyindeki CRT'nin içinde bulunduğu birçok mekanizma, kanser karşıtı doğal immunitiyi güçlendirdiği anlamını taşımaktadır [63]. Korbelik M. ve arkadaşlarının [63] yaptığı çalışmada, bir kanser tedavisi olan foto-dinamik tedavi sonrası hücre yüzeyinde CRT ekspresyonunu gözlemlediler. Foto-dinamik tedavi ile ER-stresi meydana gelmesi ve hücre yüzeyinde CRT gibi tehlike sinyalleri oluşturmasıyla sonuçlanabilir [63]. Endoplazmik retikulum, strese cevabı olarak CRT ve ERp57 şaperonlarını ortaya çıkarır ve tümör hücrelerinin fagositoz ile ölümünü potansiyalize edebilir. Mekanizma olarak kemoterapi ve radyoterapi tümör hücreleri üzerinde immunolojik molekülleri ortaya çıkarır ki, dendritik hücrelere (DH) kaynak sağlanır. Hücre yüzeyinde bulunan kalretikülin, DH tarafından apoptotik cisimlerin yakalanmasına ve spesifik CD8⁺T hücre immunitesinin meydana gelmesine katkı sağlayabilir.

Zimmerman KA. ve arkadaşlarının [64] yaptığı bir çalışmada, kronik-ER stresinin fibrotik hastalık gelişiminde önemli olduğunu gösterdiler. Fibrotik dokularda ve ER-stresinde CRT'nin arttığını gösterdiler [64]. Sonuç olarak, extrasellüler matrix protein üretiminde (yani fibronektin ve kalretikülin), profibrotik sitokin transforming growth factor-beta (TGF- β) stimülasyonu ile CRT arasında bağlantıyı saptadılar [64]. Nanney LB. ve arkadaşlarının [65] yaptığı başka bir çalışmada, CRT ve TGF- β arasındaki etkileşim olduğu gösterildi. Aynı çalışmada, exojen CRT'nin insan fibroblastlarından TGF- β ile extrasellüler matrix proteinleri olan kollojen ve fibronektin üretimini indüklediği gösterildi [65].

Exojen CRT'nin hücrenin hayatta kalma ve ölümü üstüne etkisi de Bruyn M. ve arkadaşları [66] tarafından ortaya kondu. Bu çalışmada, CRT'nin TNF-ligant immunmodulator ailesinin üyesi fasL ve TRAIL ile bağlandığı gösterildi [66]. Ancak bunlarla ayrı ayrı bağlanmanın sonuçlarının farklı olduğu gösterildi [66]. Extrasellüler CRT'nin solubl fasL ile etkileşmesi, T-hücrelerinin apoptozu tetikleyen fasL/fas etkileşimini önleyebilir [66]. Bunun aksine, CRT'nin TRAIL ile bağlanması, TRAIL/TRAIL reseptör aracılı apoptozisi önlemez [66]. Sonuç olarak, farklı TNF-ligandları ile bağlanmanın farklı immunojenik sinyal mekanizmaları ile sonuçlandığını düşündürmüştür [66].

Kalretikülin geni (CALR, calregülin) kromozom 19p 13.2 de lokalize olup dokuz exon içerir. Kalretikülin gen mutasyonları, ER'ın kaliteli kontrol mekanizmalarının ve protein katlanma cevabının bozulmasına yol açar. Kalretikülin gen mutasyonu, primer myelofibrozis veya esansiyel trombositoz hastalarının yaklaşık %20-25'inde saptanmıştır [5, 67]. Tüm CALR mutasyonları exon-9'da kümelenme (cluster) ve çerçeve kayması (frameshift) ile sonuçlanan insersiyonlar veya delesyonlarla oluşur. Şimdiye kadar 50 den fazla farklı tip mutasyon saptanmasına rağmen, CALR mutasyonu saptanan hastaların %80'inde 52-bazçifti (bp) delesyonu (TipI mutasyon) ve 5-bazçifti (bp) insersiyonu (TipII mutasyon) sıklıkla saptanmıştır [68]. Normal kalretikülin proteini, C-terminal domaini negatif yüklü olup Ca^{2+} bağlama alanı içerir. Kalretikülin gen mutasyonu sonrası yeni C-terminal mutant proteini, negatif yüklü aminoasitler yerine pozitif veya nötr yüklü aminoasitlerle yer değiştirir. Bu mutant protein ile ER'nin tutucu özelliği kaybolur. Mutant proteinle bozulan Ca^{2+} bağlama ve hücresel dislokasyonun, anormal hücre proliferasyonunda rol oynayabileceğini düşündürmüştür [5]. Son yıllarda janus-kinase-2 (JAK2) ve trombopoietin reseptör gen (MPL) negatif myeloproliferatif hastalıkların genetik nedenlerini araştırmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Klampfl T. ve arkadaşlarının [5] 2013 yılında yaptığı bir çalışmada, 6 primer myelofibrozis hastasının T lenfosit ve granülosit DNA'sı tüm-exon sekansı ile değerlendirilmiş ve hepsinde somatik CALR mutasyonu saptanmıştı. Aynı çalışmada, JAK-2, MPL ve CALR mutasyonları karşılaştırılmış ve CALR mutasyonu olanların diğer iki mutasyonu olanlara göre daha uzun genel sağkalıma sahipti [5]. Tefferi A. ve arkadaşları [69] tarafından yapılan farklı bir çalışmada, JAK-2, MPL, CALR negatif primer myelofibrozisli hastaların prognozunun kötü olduğu gösterildi.

Esansiyel trombositoz ve primer myelofibrozis dışında, belirgin trombositozu sebep olan refrakter anemili myelodisplastik/myeloproliferatif hastalıkta CALR mutasyonu saptanmıştır [70]. Trombositoz ile CALR arasındaki ilişki, bu mutasyonların öncelikle megakaryositleri etkilediğini düşündürmektedir.

Rumi E. ve arkadaşları JAK2 ve CALR mutasyonlarının, esansiyel trombositoz ve polistemia vera hastalarında önemini saptamak için yaptıkları bir çalışmada, tromboz riskinin JAK2+ iki hasta grubunda benzer olduğunu ve CALR-mutant olan ET de daha düşük olduğunu saptadılar [71]. Aynı çalışmada, CALR-mutant olan ET hastalarında polistemik transformasyon gözlemlenmezken, JAK2+ olanlarda 15 yıllık kümülatif risk %29'du [71]. Nangalia J. ve arkadaşlarının [67] yaptığı bir çalışmada, JAK2 negatif 151 myeloproliferatif neoplazmlı hastanın 70'inde (%84), 120 myelodisplastik hastanın 10'unda (%8) somatik CALR mutasyonunu saptadılar.

Tüylü hücreli lösemi nadir görülen bir B hücreli lenfoproliferatif malignite olup birçok çalışmada BRAF somatik mutasyonu ile güçlü ilişkisi ortaya konmuştur. Bunun dışında farklı somatik mutasyonlarla birlikteliği muhtemeldir. Kalretikülin gen mutasyonu da bir somatik mutasyon olup sıklıkla myeloproliferatif kanserlerde araştırılmıştır. Nangalia J. ve arkadaşlarının [67] yaptığı bir çalışma dışında lenfoid kanserlerde CALR mutasyonu araştırılmamıştır. Bu çalışmanın kontrol grubuna lenfoid neoplazmlarda eklenmiş, ancak CALR mutasyonu saptanamamıştır [67]. Yine aynı çalışmada lenfoid neoplazmlar içine tüylü hücreli lösemi dahil edilmemiştir [67].

Mutant CRT'nin daha önceden belirtildiği üzere fibrozisle seyreden hastalıklarda fazlaca saptanması, kemik iliğinde fibrozise sebep olabilen diğer bir hastalık HCL'de de varlığını düşündürmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Gaziantep Üniversitesi Hematoloji Bilim Dalı tarafından takip edilen ve 2005–2015 yılları arasında Tüylü Hücreli Lösemi tanısı almış 33 hasta retrospektif olarak incelendi. Hastalara ait demografik, laboratuvar ve klinik bilgilere hasta dosyalarından ve online veritabanından ulaşıldı. Tüylü hücreli lösemi tanısı konmuş hastalara ait kemik iliği biyopsi örnekleri Gaziantep Üniversitesi Patoloji A.B.D’ dan temin edildi ve kalretikülin gen mutasyonu Gaziantep Üniversitesi Genetik A.B.D’ da çalışıldı. Verilerin istatistiksel analizi Gaziantep Üniversitesi Biyoistatistik A.B.D tarafından sağlandı. Bu çalışma tek merkezli olarak yürütüldü. Çalışma protokolünün amacı, materyal ve metodları, gönüllü bilgilendirme metninin gözden geçirilmesi sonucunda, Helsinki Deklarasyonu Kararları’na, Hasta Hakları Yönetmeliği’ne ve Etik Kurallarına uygun olarak tasarlandığına ilişkin Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu’ndan 10.08.2015 tarihli ve 216 sayılı etik kurul onay belgesi alınmıştır.

Genetik verilerin analizi için gerekli materyal Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütme Birimi desteği ile elde edilmiştir. (Proje No: TF.15.36)

3.1. Hastalara Ait Özellikler

Hastaların Tüylü hücreli lösemi tanısı aldığı döneme ait laboratuvar bulguları, immünolojik parametreler ve görüntüleme sonuçları ile aldığı tedaviler; hasta dosyalarından, bilgisayar sistemine kayıtlı poliklinik anamnezlerinden, kayıtlı laboratuvar ve görüntüleme sonuçlarından elde edildi. Tüylü hücreli lösemi tanısı patolojik değerlendirmeye kesinleşmiş hastalar çalışmaya dahil edilmiştir.

3.2. Laboratuvar Parametreleri

Hastaların ilk tanı anında yapılan tetkiklerinin laboratuvar sonuçlarına hastaların dosyasından ve/veya bilgisayar kayıt sisteminden ulaşıldı. Tam kan sayımı, flowsitometri sonuçları, globulin düzeyi gibi laboratuvar tetkikleri Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Hematoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı’nda

çalışıldı. Biyopsi/patoloji sonuçları ve görüntüleme sonuçları Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ve Radyoloji Anabilim Dalı'nda değerlendirildi. Dalak boyutları için ultrasound görüntüleme yöntemi sonuçları dikkate alındı. Çalışılacak genetik materyal, ilk tanı anındaki kemik iliği biyopsisi parafin blok örneklerinden elde edildi.

Flowsitometrik olarak CD19, CD20, CD23, CD25, CD103 sonuçları değerlendirildi. Flow sitometri sonuçları aynı kişi tarafından yorumlanmıştı ve sonuç yorumları dikkate alındı.

3.3. Tedavi ve Remisyon Kriterleri

Nötropeni (nötrofil sayısı $<1 \times 10^9/L$), anemi (hemoglobin $< 10 \text{ g/dL}$), trombositopeni (trombosit $<100 \times 10^9/L$), semptomatik splenomegali veya semptomatik hastalık varlığında tedavi uygulandı. Kladribin, 0.14 mg/kg/gün dozunda 7 günlük devamlı intravenöz infüzyon şeklinde uygulandı.

Hastaların aldığı tedavi, siklus sayısı, tedaviye cevap durumu hastaların dosyasından ve/veya bilgisayar kayıt sisteminden ulaşıldı. Remisyon anından relapsa kadar geçen süre relapssız sağkalım (Relapse free survival/RFS) olarak belirlendi. Hastalığın tanısının konduğu günden ölüm/son takip süresine kadar geçen süre genel sağkalım (Overall survival/OS) olarak belirlendi.

Tedavi sonrası 3-6. aylar arasında yapılmış olan kemik iliği biyopsisi ve laboratuvar bulguları tedaviye yanıt durumunu belirlemede kullanıldı. Tam kan sayımında Hemoglobin $> 12 \text{ g/dL}$, trombosit $>150 \times 10^9/L$, nötrofil $1.5 \times 10^9/L$ ile birlikte dolaşan kanda tüylü hücrelerin bulunmaması, splenomegalinin gerilemesi ve kemik iliği biyopsisinde tüylü hücrelerin görülmemesi tam cevap (Complete remission, TR) olarak belirlendi. Kötü hematolojik cevap ile persistan splenomegali, sitopeni varlığı ve periferik yaymada tüylü hücrelerin görülmesi kısmi yanıt (Partial response, PR) olarak belirlendi. Bu remisyon kriterlerinde Fransız hematoloji birliğinin önerileri kullanıldı [72].

3.4. Örneklerin İncelenmesi

3.4.1. Parafin Dokusundan DNA izolasyonu

Patoloji Anabilim Dalında tüylü hücreli lösemi tanısı kesin olan hastaların parafin doku bloklarından 5 mikron kalınlığında 10 kesit eppendorf tüpe alındı. Eppendorf tüpteki parafin blok kesitlerine ksilen (55°C 'de ısıtılmış) eklendi, vortexlendi ve 1 saat 55°C 'de bekletildi. Ksilen eritilene kadar bu işleme devam edildi.

Erime işlemi sonrasında dokuya %96'lık etanol eklendi, vortexlendi ve santrifuj edildi. Supernatant atıldı ve alkolü tamamen uzaklaştırmak için 37 °C'de 10 dakika bekletildi. İzolasyon işlemi sırasında QIAamp DNA FFPE TISSUE KIT (kat.no. 56404) kiti kullanıldı. Kit tamponlarından ATL ve proteinaz K kurumuş pellete eklendi. Bir gece 56 °C'de inkübe edildi. 90 °C'de 1 saat tekrar inkübe edildi. Inkubasyon işlemi sonrasında dokuya Buffer AL ve etanol eklendi, filtreli tüplere aktarıldı. AW1 ve AW2 bufferları ile bir kez yıkandı ve filtreden alkolü tamamen uzaklaştırmak için 13000 rpm'de 2 dakika santrifuj edildi. Buffer ATE eklendi ve DNA eppendorf tüpe dilue edildi. İzole DNA sonraki işlemlerde kullanılmak üzere – 20 °C'de saklandı.

3.4.2. Hedef Bölgelerin Çoğaltımı İçin Primer Dizaynı

Kalretikülin geni 9. Ekzonu için NCBI veritabanı ve Serial Cloner programı kullanılarak en uygun primer çiftleri belirlendi. Bu ekzon birbini takip eden toplam 4 bölgeye ayrıldı ve primer çiftleri elde edildi.

CALR Geni 9. Ekzon Bölgesine Ait Baz Dizilimi

```
AGAAACAAATGAAGGACAAACAGGACGAGGAGCAGAGGCTTAAGGAGGAGGAAGAAGACAAGAAACGCAA
AGAGGAGGAGGAGGCAGAGGACAAGGAGGATGATGAGGACAAAGATGAGGATGAGGAGGATGAGGAGGAC
AAGGAGGAAGATGAGGAGGAAGATGTCCCCGGCCAGGCCAAGGACGAGCTGTAGAGAGGCCTGCCTCCAG
GGCTGGACTGAGGCCTGAGCGCTCCTGCCGCAGAGCTGGCCGCGCCAAATAATGTCTCTGTGAGACTCGA
GAACTTTTCATTTTTTTCCAGGCTGGTTTCGGATTTGGGGTGGATTTTGGTTTTGTTCCCTCCTCCACTCT
CCCCACCCCTCCCGCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTAACTGGTATTTTATCTTTGAT
```

Bölge Uzunluğu: 410 bp

Dizayn Edilen Primer Çiftleri

Bölge 1

CALR FW 1: CCCTGAGGTGTGTGCTCTG

CALR RW 1: CTCAGGCCTCAGTCCAGC

Ürün uzunluğu: 262 bp

Bölge 2

CALR FW 2: GGCCAAGGACGAGCTGTAGA

CALR RW 2: AGGTTGGAGGGGAGCTAAGA

Ürün uzunluğu: 331

Bölge 3

Forward primer: CCTCACCCCTGGTTCTCATC

Reverse primer: TGAAATGAGAAGAGCCCCGT

Ürün uzunluğu: 222

Bölge 4

Forward primer: CCTGAGATTTTCATCTGCTCTCCT

Reverse primer: TTCCTTAAGTCTGTCTTTCCCCA

Ürün uzunluğu: 276

3.4.3. Hedef Bölgelerin PCR Reaksiyonu ile Çoğaltımı

Hedef bölgelerin PCR reaksiyonu ile çoğaltımı işlemi, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkezi Laboratuvarı Moleküler Tanı Birimi'nde Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler cihazı ile gerçekleştirildi (**Tablo 1.**).

Tablo 1. Hedef bölgelerin çoğaltımı için hazırlanan PCR karışımı oranları

Kullanılan Reaktifler	Kullanılan Hacim
Big Dye Cyle Sequencing V3.1 Kit	15,375 µl
10x Tampon	2,5 µl
Magnezyum Klorür	1,5 µl
dNTP'ler	1,5 µl
İleri primer	1 µl
Geri primer	1 µl
Taq DNA Polimeraz	0,125 µl
Örnek DNA	2 µl
Su	15,375 µl
Toplam Hacim	25 µl

PCR Reaksiyonu İçin Kullanılan Thermal Cycler Protokolü

95° C 5 dk

95° C 30 sn**60.7° C 30 sn**

35 Döngü

72° C 30 sn

72° C 5 dk

4° C ∞

3.4.4. DNA Dizi Analizleri İle Mutasyonların Tespiti

DNA nükleotid dizileme işlemi, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkezi Laboratuvarı Moleküler Tanı Birimi'nde ABI 3130 DNA Dizi Analiz Cihazı ile gerçekleştirildi. Kalretikülin genine özgün primerler kullanılarak hedef bölge PCR reaksiyonu ile çoğaltıldı. Elde edilen ürün agaroz jel elektroforezi yapılarak görüntülendi. Uygun büyüklükteki PCR ürünü varlığı tespit edildikten sonra sekans PCR'ı yapıldı. Dizi analizi için, ABI Prism Big Dye, AmpliTaq DNA polimeraz enzimi, kalretikülin primerleri kullanıldı. DNA dizi analizi için hazırlanan PCR karışımı Tablo 2'de verilmiştir. Hazırlanan PCR karışımı, 96 °C'de 1 dakika bekletildi. Daha sonra, 96 °C'de 10 saniye, 50 °C'de 5 saniye ve 60 °C'de 4 dakikadan oluşan 25 döngü ile PCR işlemi gerçekleştirildi ve örnekler cihaza yüklenene kadar +4 °C'de bekletildi.

Otomatik DNA dizilemesinde, PCR ürünleri Sephadex'ten geçirilip temizlendikten sonra cihaza yüklendi. Bu amaçla 1 gr Sephadex 14 ml saf su içerisinde çözüldü ve kolonlara 600 µl olacak şekilde dağıtıldı. 2000xg'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra Sephadex'li kolonlar başka bir tüpe alındı ve 10 µl PCR ürünü Sephadex üzerine bırakıldı. Santrifüj işlemi 2000xg'de 2 dakika olarak gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası alttaki tüpe geçen ürünlerin DNA dizilemesi yapıldı.

Otomatik DNA dizileme sistemi, Sanger'in DNA dizi sonlandırma yöntemine göre çalışmaktadır. DNA dizi analizinde kullanılan ddNTP'lerin her biri farklı bir floresan boya ile işaretlenmişlerdir ve çoğaltılan DNA parçacıkları, kılcal borucuklara yüklenen "jel matriks" içerisinde yürütülerek floresan boyaları otomatik olarak algılayan bir algılayıcıya yönlendirilmekte ve burada tanımlanmaktadır.

Tablo 2. Otomatik DNA dizileme için hazırlanan PCR karışımı oranları (Sekans PCR)

Kullanılan Reaktifler	Kullanılan Hacim
Big Dye Cyle Sequencing V3.1 Kit	2 µl
5x Dizileme Tamponu	2 µl
İleri yada geri primer	2 µl
Örnek DNA	2 µl
Su	2 µl
Toplam Hacim	10 µl

3.5. İstatistiksel Analiz

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shaphiro wilk testi ile test edildi. İki bağımsız grup karşılaştırılmasında normal dağılmayanlar için Mann Whitney U testi kullanıldı. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiler Ki-kare testi ile test edildi. Yaşam olasılıkları Kaplan Meier yöntemi ile tahmin edildi, farklı gruplarda yaşam eğrilerinin karşılaştırılmasında Log-Rank testi uygulandı. Analizler SPSS 22 windows versiyonu kullanıldı. $P < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

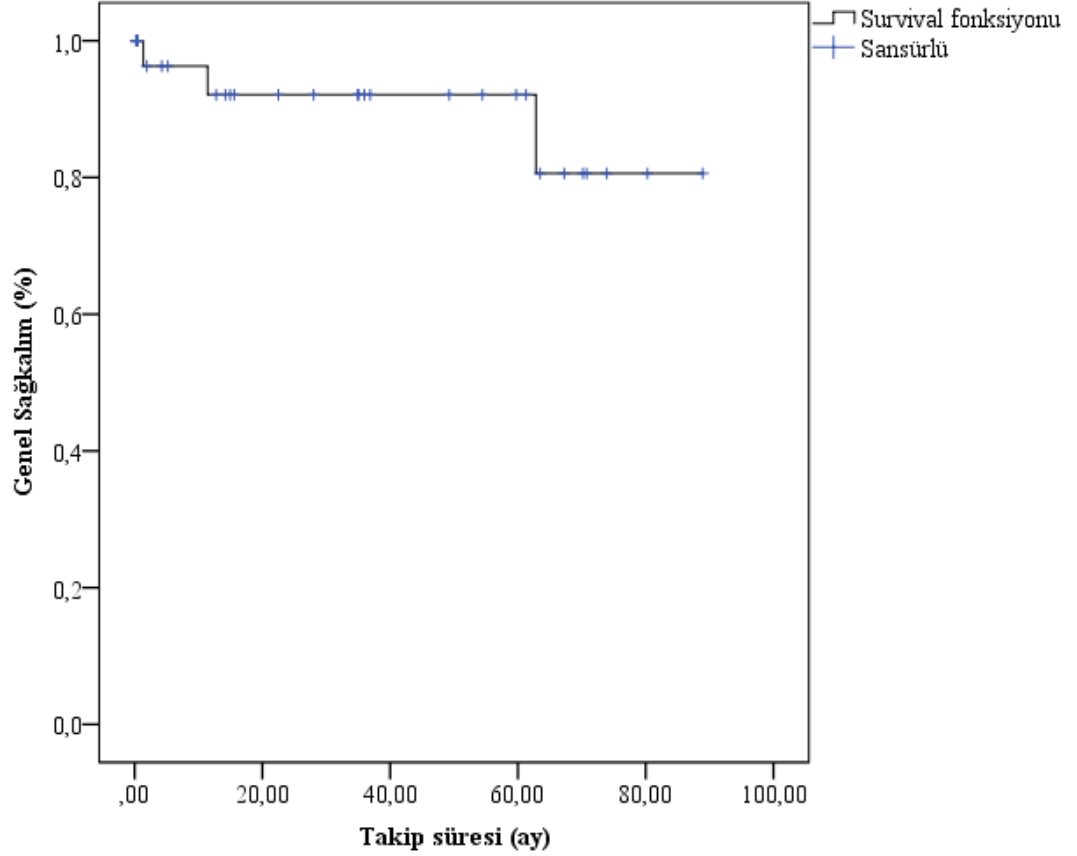
4. BULGULAR

Tüylü hücreli lösemi tanısı alan 33 hasta değerlendirildi. Ortalama yaş 55.3 ± 13.3 olarak saptandı. Otuz üç hastanın 26'sı (%78.8) erkek, 7'si (%21.2) kadındı. Hastaların 22 (%73.3)'sinin hemoglobini (Hgb) 12 g/dL altında olup tanı anında anemisi vardı. Yirmi bir (%70) hastanın trombosit (PLT) sayısı $100 \times 10^9/L$ altındaydı. On dört (%48,3) hastanın nötrofil (Neu) düzeyi $1 \times 10^9/L$ 'nin altındaydı. On iki (%41.4) hastanın monosit (Mon) düzeyi $0.2 \times 10^9/L$ altındaydı. Verisine ulaşılan 27/30 (%90) hastanın splenomegalisinin olduğu saptandı. Hastaların 23'ü (%69.7) tüylü hücreli lösemiye yönelik tedavi almıştı. Yirmi üç hastanın tamamına kladribin (CdA) tedavisi verilmişti. Hastaların 2'sine (%8.7) splenektomi yapılmıştı. Tedavi alan hastaların 16'sının (%69.5) remisyona girdiği saptandı. Remisyona giren hastaların 13'ü (%81.3) tam remisyon (TR), 3'ü (%18.8) parsiyel remisyondur (PR). Tek siklus kladribin ile remisyona girmeyen 3 hastaya 2. Siklus kladribin tedavisi verilmişti. Takip edilen 33 hastanın 3'ü (%9.1) kaybedildi. Kaybedilen hastardan iki tanesi hastalık dışı komobid bir durum nedeni ile kaybedildi. Remisyonda (TR+PR) takip edilen 16 hastadan 4'ünde (%25) relaps oldu. Flow cytometri (akım sitometrisi) sonucuna ulaşılan 12 hastadan 8'i (%66.6) bu tetkikle HCL tanısı almıştı. Kemik iliği biyopsisi ile değerlendirilen fibrozis düzeyleri (grade 0-4 arası); grade-0 1 (%3.1), grade-1 4 (%12.5), grade-2 15 (%46.9), grade-3 11 (%34.4), grade-4 1 (%3.1) hastada saptandı. Hafif düzey kemik iliği fibrozisi (grade-0, 1, 2) 20 (%62.5), ileri düzey kemik iliği fibrozisi (grade-3, 4) 12 (%37.5) hastada saptandı (**Tablo 3**).

Medyan WBC $2.7 \times 10^9/L$ (2.25-4.45), lenfosit (LYM) $1.3 \times 10^9/L$ (0.83-2.15), Hgb 9.5 (8.45-11.7) g/dL, PLT $58 \times 10^9/L$ (39.75-123.75), Neu $1 \times 10^9/L$ (0.52-1.55), Mon $0.28 \times 10^9/L$ (0.12-1.2) olarak saptandı. Medyan dalak boyutu 20.3 (16.5-24) santim olarak saptandı. Kemik iliğinde saptanan medyan B lenfosit yüzdesi % 80 (70-90) olarak saptandı (**Tablo 3**).

1 yıllık ve 5 yıllık sağkalım %92.1 olarak saptandı. Ortalama sağkalım 79.4 ± 5 aydı (Şekil-1).

Mutasyon analizine ulaşılan 3 hastanın BRAF'ı negatif olarak saptandı. Yirmi bir hastanın CALR mutasyon analizi yapıldı ve hepsi negatifti.



Şekil-1: Tüm hastaların genel sağkalım grafiği (%). (Kaplan Meier Yöntemi)

Tablo 3. Hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri.

Özellikler	Sayı (%)
Yaş (yıl, ortalama)	55.3 ± 13.3
Cinsiyet	
Erkek	26 (%78.8)
Kadın	7 (%21.2)
Anemi (<12g/dL)	22 (%73.3)
Trombositopeni (<100x10⁹/L)	21 (%70)
Nötropeni (<1 x10⁹/L)	14 (%48.3)
Monositopeni (<0.2 x10⁹/L)	12 (%41.4)
Splenomegali	27 (%90)
Splenektomi	2 (%8)
Tedavi alan hasta	23 (%69.7)
Kladribin tedavisi	23 (%100)
Remisyon durumu	
Tam remisyon (TR)	13 (%56,5)
Parsiyel remisyon (PR)	3 (%13)
Remisyon yok	7 (%30.5)
Relaps	4 (%25)
CALR mutasyonu	0 (%0)
BRAF mutasyonu	0 (%0)
Flow sonucuna ulaşılan hasta	12 (%36)
Pozitif	8 (%66.6)
Negatif	4 (%33.4)
Kemik iliği fibrozisi	
Grade 0 fibrozis	1 (%3.1)
Grade 1 fibrozis	4 (%12.5)
Grade 2 fibrozis	15 (%46.9)
Grade 3 fibrozis	11 (%34.4)
Grade 4 fibrozis	1 (%3.1)
Genel fibrozis düzeyi	
Hafif (Grade 0, 1, 2)	20 (%62.5)
İleri (Grade 3, 4)	12 (%37.5)
Medyan WBC x10⁹/L, (%25-75)	2.7 (2.25-4.45)
Medyan LYM x10⁹/L, (%25-75)	1.3 (0.83-2.15)
Medyan Hgb g/dL, (%25-75)	9.5 (8.45-11.7)
Medyan PLT x10⁹/L, (%25-75)	58 (39.75-123.75)
Medyan Neu x10⁹/L, (%25-75)	1 (0.52-1.55)
Medyan Mon x10⁹/L, (%25-75)	0.28 (0.12-1.2)
Medyan Dalak boyutu (CM), (%25-75)	20.3 (16.5-24)
Medyan Kemik iliği B lenfosit (%)	80 (70-90)
WBC: Beyaz Küre LYM: Lenfosit Hgb: Hemoglobin	CALR: CRT
Neu: Nötrofil Mon: Monosit CM: Santim	Mutasyonu
PLT: Trombosit Normal dağılım: Shaphiro wilk	Normal dağılmayan:
	Mann-Whitney U

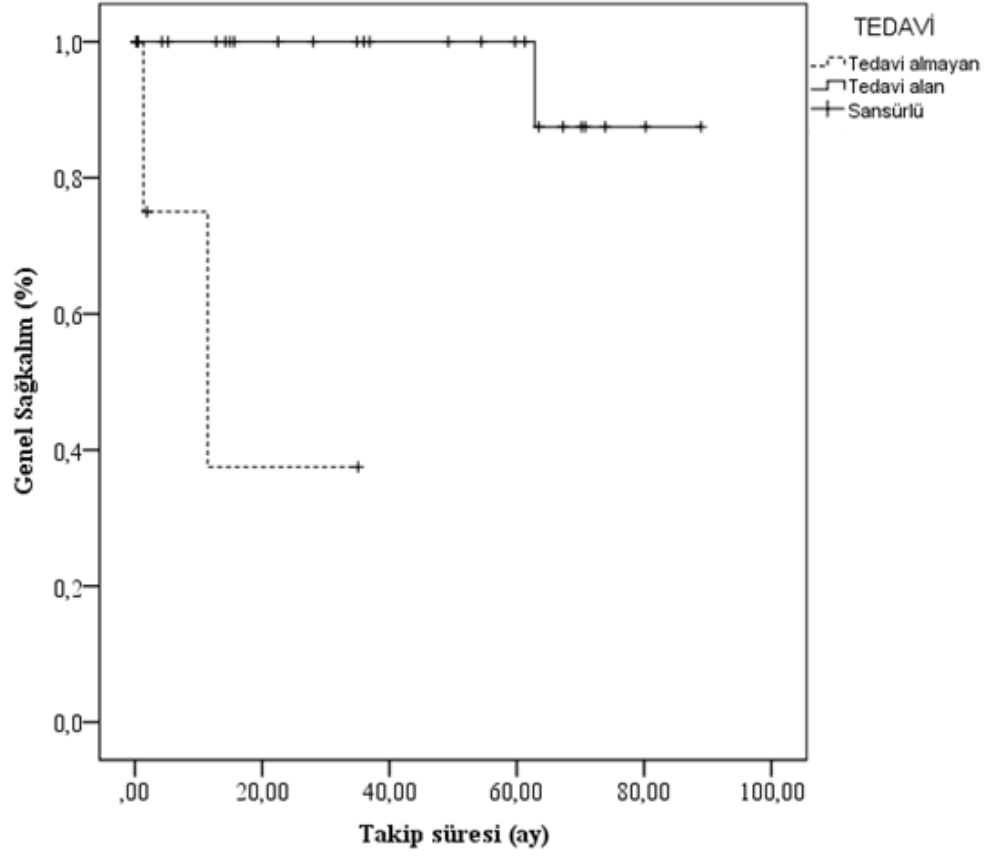
Hafif (Grade 0, 1, 2) ve ileri (Grade 2,3) düzey kemik iliği fibrozisi ile akım sitometrisi yöntemi ile HCL tanısı alan ve almayan hastalar arası ($p=0.22$), splenomegali arasında ($p=0.26$), remisyona girme durumu ($p=1.00$) arasında anlamlı ilişki saptanmadı. Cinsiyete göre remisyona girme durumu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=1.00$). Monositopeni ile splenomegali varlığı değerlendirildiğinde; monositopenisi olmayanlarda splenomegali görülme sıklığı anlamlı olarak yüksek bulundu (**$p=0.05$**).

Cinsiyete göre genel sağ kalım arasında fark bulunamadı ($p=0.56$). Kadın hastalarda ölüm olmadığı için genel sağ kalım süresi hesaplanamadı. Hafif ve ileri düzey fibrozis ($p=0.70$), trombositopenisi olan ve olmayan ($p=0.56$), nötropenisi olan ve olmayan ($p=0.36$), anemisi olan ve olmayan ($p=0.3$), monositopenisi olan ve olmayan hastalar arası sağ kalım farkı saptanmadı ($p=0.14$) (**Tablo 4**).

Tedavi alan (23 hasta) ve almayan (10 hasta) hastalar arası sağ kalımda anlamlı fark olduğu saptandı (Sırasıyla, ay ortalaması: 85.6 ± 3 ve 17.7 ± 7.8) (**$p=0.001$**) (**Şekil-2**). Remisyona giren (16 hasta) ve girmeyen (7 hasta) arası genel sağ kalım farkı saptanmadı ($p=0.19$). Remisyon grupları (TR/PR) arasında sağ kalım farkı saptanmadı ($p=0.19$) (**Tablo 4**).

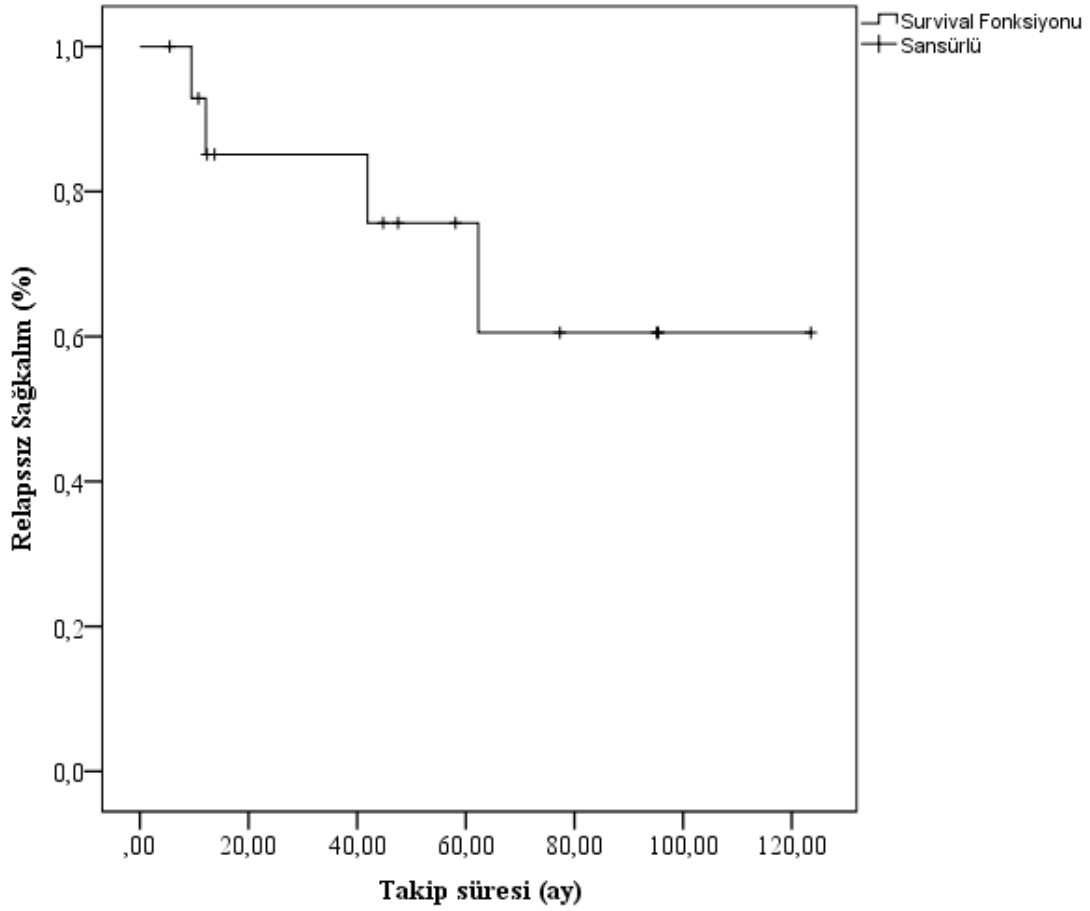
Tablo 4. Gruplar arası sağkalım analizi.

Sağkalım	P Değeri
Cinsiyete (E/K)	0.56
Fibrozis (Hafif/İleri)	0.70
Trombositopeni (Var/Yok)	0.56
Nötropeni (Var/Yok)	0.36
Anemi (Var/Yok)	0.3
Monositopeni (Var/Yok)	0.14
Tedavi (Alan/Almayan)	0.001*
Remisyon(Evet/Hayır)	0.19
Remisyon durumu (TR/PR)	0.19
Log-Rank testi Ki-Kare testi	$P<0.05$* anlamlı



Şekil-2: Tedavi durumuna göre sağkalım farkı ($p=0.001$) (Kaplan Meier Yöntemi)

Relapsa kadar geçen süre; 1 yıllık %92.9, 2 yıllık %85.1, 5 yıllık %75.7 olarak saptandı. Relaps olmadan sağ kalım ortalaması (Relapse free survival-RFS) 89.76 ± 13.71 aydı (**Şekil-3**).



Şekil-3: Relapsız sağ kalım (RFS) grafiği (Kaplan Meier Yöntemi)

Remisyona durumuna göre hastaların tanı anındaki laboratuvar değerleri karşılaştırıldığında medyan yaş ($p=0.62$), WBC ($p=0.4$), LYM ($p=0.06$), PLT ($p=1.0$), Neu ($p=0.58$), Mon ($p=0.4$), Globulin (0.74) dalak boyutu ($p=0.95$) değerleri arasında anlamlı fark saptanmadı. Ancak remisyona giren hastaların medyan Hgb değeri (10.1 g/dL) remisyona girmeyen hastaların medyan Hgb değerinden (8.5 g/dL) daha yüksek olup aralarında istatistik olarak anlamlı fark vardı ($p=0.04$) (Tablo 5).

Tablo 5. İlk basamak tedavi sonrası remisyona giren ve girmeyen hastalar arası farklar

Değişkenler (Medyan)	Remisyon-Evet	Remisyon-Hayır	P değeri
WBC x10⁹/L, (%25-75)	2.7 (2.5-3.83)	4.25 (2.1-5.2)	0.4
LYM x10⁹/L, (%25-75)	1.14 (0.72-1.4)	1.35 (1.24-3)	0.06
Hgb g/dL, (%25-75)	10.1 (8.3-13.2)	8.5 (6.5-10)	0.04*
PLT x10⁹/L, (%25-75)	57 (34-144)	52 (40-87)	1.0
Mon x10⁹/L, (%25-75)	0.2 (0.04-0.4)	0.3 (0.11-1.74)	0.4
Neu x10⁹/L, (%25-75)	1 (0.42-1.4)	0.61 (0.5-1.25)	0.58
Globulin	3.16 (2.72-3.6)	2.9 (2.61-3.58)	0.74
Dalak boyutu, CM	18.3 (16.37-22.2)	19.5 (14.4-28.5)	0.95
Yaş, yıl	56.5 (45.5-64.25)	53 (46-56)	0.62
WBC:Beyaz Küre	PLT:Trombosit	Neu:Nötrofil	
LYM:Lenfosit	Hgb:Hemoglobin	Mon:Monosit	
Mann-Whitney U testi			P<0.05*

5. TARTIŞMA

Tüylü hücreli lösemi etyopatogenezi henüz net olarak aydınlatılamamış B hücreli yavaş seyirli bir malignitedir. Etyopatogenezi aydınlatmaya yönelik çalışmalar genetik temelli olarak yoğunlaşmıştır. Bunun sonucunda bir serin/treonin kinaz olan BRAF'da (RAF'ın izoformu) V600E aktive edici mutasyonunu HCL patogenezinde suçlamıştır [7-9]. Ancak, farklı genetik mekanizmaların hematolojik hastalıkların oluşum sürecine katkıda bulunacağı yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Son zamanlarda myeloproliferatif hastalıklarda araştırılan CALR exon 9 mutasyonlarının varlığının, hastalarda farklı klinik ve laboratuvar bulgularla seyrettiği tespit edilmiştir. Klonal myeloproliferatif hastalıklardan Janus-Kinaz 2 (JAK2) ve myeloproliferatif lösemi geni (MPL) negatif olanlarda CALR mutasyonu saptanmış ve daha az tromboz riski, daha genç yaşta tanı, daha yüksek trombosit sayısı ve daha uzun sağ kalımla ilişkili bulunmuştur [5, 69, 71, 73]. Klonal myeloproliferatif hastalıklar dışındaki neoplazmlarda da bu mutasyon aktif araştırma konusu olmaya başlamıştır. Myeloproliferatif hasta örneklerinde bu mutasyonun araştırıldığı bir çalışmada 287 lenfoid kanser örneğinde mutasyon analizi yapılmış fakat hepsi negatif olarak saptanmıştı [67]. Ancak literatürdeki bu çalışmada tüylü hücreli lösemi hastaları çalışmaya alınmamıştır. Bu veriler ışığında CALR mutasyonunun lenfoproliferatif bir hastalık olan tüylü hücreli lösemide varlığını araştırdık. Çalışmamızda, merkezimizde HCL tanısı almış 33 hastanın kemik iliği biyopsi doku örneklerinde gen sekans analiz yöntemi kullanılarak CALR mutasyonu araştırıldı ve analiz edilebilen 21 dokunun hiçbirinde mutasyon varlığı saptanmadı. Ayrıca 3 hastanın BRAF mutasyonu ilk tanı anında değerlendirilmişti ve hepsi negatifti. Bu bulgu Tüylü Hücreli Lösemi hastalığı patogenezinde CALR mutasyonunun rolü olmadığını düşündürmektedir. Tüylü hücreli lösemi hastalarında kalretikülin mutasyonunun saptanmadığı yönündeki ilk bilgiyi bu çalışmada elde ettik. Ancak bu çalışma hastalığa ait bazı klinik, demografik ve laboratuvar özellikleri açısından değerlendirme yapmamıza olanak sağlamıştır. Tek

merkezli çalışmamızda, HCL hastalarının birinci basamakta kladribin tedavisinin sonuçlarını retrospektif olarak değerlendirmemize olanak sağlamıştır.

Tüylü hücreli lösemi hastalığının daha çok ellili yaşlarda ve erkeklerde görüldüğü bilinmektedir [74]. Çalışmamızda yaş ortalaması 55.3 ± 13.3 (medyan yaş 54) olup hastaların 26'sı %78.8'i erkekti. Yine literatürle ve daha önceki hasta serilerine benzer şekillerde değişen oranlarda sitopeniler saptandı. Fizik muayene bulgularından olan palpabl splenomegali çalışmamızda %90 oranında saptandı. Kemik iliği biyopsileri %81.3 oranında grade 2 ve grade 3 fibrozis gruplarına kümelenmişti. Geçmiş yıllarda yayınlanmış bir seride grade 2-3 fibrozis %68.7 olarak saptanmış olup çalışmamızdan farklıydı [75]. Referans aldığımız bu çalışmanın [75] çok merkezli yapılmış olması ve merkezler arası patolojik farklılığı nedeniyle olabileceği düşünüldü. Hastalığın karakteristik özelliklerine vurgu yapan bazı çalışmalarda splenomegali HCL hastalarında %80-90 saptanmış olup bizde benzer sonuçları elde ettik [23-24]. Birinci basamak tedavide 23 hastanın tümüne kladribin tedavisi uygulamıştık. İki hastaya splenektomi yapılmıştı. Splenektomi yapılan hastalardan bir tanesine kliniğimize başvurmadan önce muayene olduğu farklı bir hastanede masif splenomegali nedeniyle operasyon yapılmıştı. Bu hastanın splenektomi patoloji raporuna ulaşamadı. Splenektomi yapılan ikinci hastamız hastanemizde opere edilmiş olup patolojisi tüylü hücreli lösemiyle uyumluydu. Tedavi endikasyonu koyulmaması, tedaviye uygun olmama ve takibe gelinmemesi gibi nedenlerle kalan hastalar tedavi almamıştı. Tedavi alan hastalarda daha uzun sağkalım elde edildi (Sırasıyla, ay ortalaması: 85.6 ± 3 ve 17.7 ± 7.8) (**p=0.001**).

Bir laboratuvar parametre olan monositopeni ($<0.2 \times 10^9/L$) ile splenomegali varlığı değerlendirildiğinde; monositopenisi olmayanlarda splenomegali görülme sıklığı anlamlı olarak yüksek bulundu (**p=0.05**). Tüylü hücreli lösemi hastalığında bir laboratuvar parametre ile hastalığın fizik muayene bulgularının tahmininde bu verinin katkısı olabilir. İlginç olan monosit sayısı ile splenomegali birlikteliğinin aynı yönde korelasyonuydu. Elde edilen bu bilgi ilk defa çalışmamızda tanımlanmış olup yapılan literatür taramasında bu konu ile ilgili başka bir bilgiye rastlamadık.

Tüylü hücreli lösemi tanısı alan hastaların erken tedavi edilmesinin avantaj sağlayacağı net değildir. Tedavi endikasyonu olan hastaların pürin analogları (kladribin

ve pentostatin) ile tedavisi diğer tedavi modalitelerinin yerini almıştır. Kladribinin tek siklus olarak uygulama kolaylığı birinci basamakta tercih edilmesi sağlamıştır. Bizim çalışmamızda tedavi uygulanan 23 hastanın tamamına standart doz kladribin infüzyonu verilmişti. Çeşitli çalışmalarda kladribin tedavisi sonrası tam remisyon %76-80 ve parsiyel remisyon %7-24 aralığındaki oranlarda başarılmıştı [39, 42, 54, 76]. Bu bilgilerin aksine çalışmamızda tam remisyon %56.5, parsiyel remisyon %13 ve genel remisyon oranı (TR+PR) %69.5 ile literatürdeki çalışmalara göre daha düşüktü. Yapılan çalışmalarda kladribin tedavisi sonrası 4 yıllık progresyonsuz sağkalım %72-84 ve genel sağkalım %86-96 olarak saptanmıştı [43, 54, 77-79]. Bizim yaptığımız çalışmada 1 yıllık ve 5 yıllık genel sağkalım %92.1 olarak saptandı. Relapsa kadar geçen bir yıllık tahmini sağkalım %92.9, iki yıllık %85.1 ve beş yıllık %75.7 olarak saptandı. Bir çalışmada tanımlanan 4 yıllık relaps riski yaklaşık %30'du [80]. Tanımladığımız 5 yıllık relaps tahmini %24.3 olup daha önce tanımlanan çalışmaya benzerdi.

Çalışmamızdaki remisyon oranlarının literatürdeki oranlara göre daha düşük saptanması üzerine remisyona giren ve girmeyen hastaların laboratuvar ve klinik parametreleri arasındaki farkı analiz ettik. Tüylü hücreli lösemi ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda; ileri yaş, düşük hemoglobin düzeyi, düşük trombosit düzeyi, lökopeni, lökositoz, splenektomi, lenfadenopati, tanıdan sonra erken tedavi, önceden tedavi almış hasta ve düşük performans durumu tedaviye zayıf cevapla ilişkili bulunmuştur [43-44, 81-86]. Bizim yaptığımız çalışmada, remisyona giren (TR+PR) ve remisyona girmeyen hastaların tanı anındaki WBC, LYM, PLT, Neu, Mon, Globulin, dalak boyutu ve yaş parametreleri arasında istatistik olarak anlamlı bir fark saptayamadık. Ancak her iki grubun tanı anındaki hemoglobin düzeyleri arasında istatistik olarak fark saptandı (**p=0.04**). Remisyona giren hastaların hemoglobin düzeyi remisyona girmeyen hastalara göre anlamlı olarak yüksekti. Anemi düzeyi olarak belirlediğimiz 12 g/dL üstündeki değerler remisyona girme ihtimalini istatistiksel olarak arttırdığı görüldü. Tedavi zamanlaması açık olmayan bu hastalıkta, remisyona girmeyi kolaylaştırdığı ve kladribin tedavisinin kabul edilebilir toksisite ile uygulanabildiği dikkate alınınca tedavi endikasyonları arasındaki Hgb < 10 g/dL düzeyi, 12 g/dL düzeyinde çıkarılabilir. Ancak tedavi öncesi diğer laboratuvar ve klinik parametrelerin de dikkate alınması gerektiği açıktır. Tam remisyon ve kısmi remisyon olan hastalar arasında ölüm olmadığı için genel sağkalım farkı hesaplanamadı. Yine tam ve kısmi remisyon olan hastalardan

kısmi remisyona giren hastaların sayısının az olmasından dolayı başlangıç laboratuvar değerleri, yaş, dalak boyu parametreleri arasında karşılaştırma yapılamadı.

İlk siklus kladribin tedavisi sonrası remisyona girmeyen rezistan hastalardan 3'üne ikinci siklus kladribin tedavisi verilmişti. Ancak literatürdeki bilgilerden farklı olarak hiçbiri 2. Siklustan sonra remisyona girmediler. Çalışmamızı yaptığımız sırada, bu üç hastanın genel sağkalımları 23, 28, 70 ay olup halen hayattalardı. Geçmiş on yılı kapsayan çalışmamızda hayatını kaybeden üç hasta vardı ve tamamı erkekti. Hastalığın daha çok erkeklerde görülmesi bu veriye ulaşmamıza neden olmuş olabilir. Ancak hayatını kaybeden üç hastadan ikisi HCL dışında komorbid nedenlerden dolayı hayatını kaybetmişti. Bu hastalardan ilki tüberküloz peritoniti ve polimiyozit, bir diğeri diyabetik nefropati ve HCL tanısından 6 yıl sonra yeni tanı konulan diffüz büyük B lenfoma komplikasyonları nedeniyle hayatını kaybetmişti. Yalnızca bir hasta tanı anında pansitopeni ve pnömoni sonucu hayatını kaybetmişti.

Sonuç olarak HCL hastalığı tedavi ile kür şansı olabilen ve tedavi sonrası uzun sağkalımla birlikte seyreden bir hastalıktır. Hastalığın yavaş seyirli olması ve az görülüyor olması ile birlikte muhtemel daha ileri yaşta tanı konmasındaki güçlükler sıklığının az olmasında etkisi olabilir. Kemoterapi sonrası potansiyel komplikasyonların hastalık ile ilişkili komorbiditelerden daha kabul edilebilir olması nedeniyle endikasyon konulduğu zaman pürin analogları ile tedavisinin yapılması gerekmektedir. Diğer taraftan tedavi edilen hastalarımızın genel remisyona oranlarının düşük olması, bu durumda klinik parametreler dışında farklı genetik ve çevresel faktörlerin rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmamızda remisyona giren hastaların hemoglobin değerlerinin remisyona girmeyenlerden daha yüksek olduğunu tespit ettik. Ancak hastalığın genetik temeline yönelik yaptığımız kalretikülin mutasyon analizinde herhangi bir mutasyona rastlayamadık. Lenfoproliferatif bir hastalık olan tüylü hücreli lösemisini patogenezinde bu mutasyonun etkisinin olmadığını kanaatindeyiz.

Çalışmamızın retrospektif karakteri bazı verilere ulaşmakta ana kısıtlayıcı neden olmuştur. Daha geniş çaplı prospektif hasta serileriyle yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- 1- Kalretikülin gen mutasyonu tüylü hücreli lösemi hastalarında saptanamadı. Bu nedenle prognoz üstüne etkisi olduğuna dair bir veri elde edemedik.
- 2- Tüylü hücreli lösemi hastalarına, endikasyonu alması durumunda tedavi uygulamanın sağkalıma etkisi anlamlı düzeydedir.
- 3- Çalışmanın retrospektif olması bazı verilere erişimi engellemiştir.
- 4- Bu hasta grubunda monositopenisi olmayanlarda splenomegali saptanacağı bilgisini elde ettik. Bu veri, bir laboratuvar parametre ile klinik bulgu korelasyonunda kullanabileceğimiz değerli bir bilgi gibi görünmektedir.
- 5- Çalışmamız retrospektif bir çalışmadır. Hastaların uzun süreli takibi ve bulguların klinik yansımasının izlenmesi ek katkı sağlayabilir.
- 6- Daha geniş hasta serilerinde uzun süreli prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Bouroncle BA, Wiseman BK, and Doan CA. Leukemic reticuloendotheliosis. *Blood*, 1958; 13(7): 609-30.
2. Eggleton P. and Michalak M. Calreticulin for better or for worse, in sickness and in health, until death do us part. *Cell Calcium*, 2013; 54(2): 126-31.
3. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J*, 2009; 417(3): 651-66.
4. Wang WA, Groenendyk J, and Michalak M, Calreticulin signaling in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012; 44(6): 842-6.
5. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*, 2013; 369(25): 2379-90.
6. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*, 2006; 107(1): 265-76.
7. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*, 2011; 364(24): 2305-15.
8. Schnittger S, Bacher U, Haferlach T, Wendland N, Ulke M, Dicker F, et al. Development and validation of a real-time quantification assay to detect and monitor BRAFV600E mutations in hairy cell leukemia. *Blood*, 2012; 119(13): 3151-4.
9. Shao H, Calvo KR, Grönborg M, Tembhare PR, Kreitman RJ, Stetler-Stevenson M, et al. Distinguishing hairy cell leukemia variant from hairy cell leukemia: development and validation of diagnostic criteria. *Leuk Res*, 2013; 37(4): 401-9.

10. Tiacci E, Schiavoni G, Forconi F, Santi A, Trentin L, Ambrosetti A, et al. Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation. *Blood*, 2012; 119(1): 192-5.
11. Dietrich S, Glimm H, Andrulis M, von Kalle C, Ho AD, Zenz T. BRAF inhibition in refractory hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*, 2012; 366(21): 2038-40.
12. Ward FT, Baker J, Krishnan J, Dow N, Kjobech CH. Hairy cell leukemia in two siblings. A human leukocyte antigen-linked disease? *Cancer*, 1990; 65(2): 319-21.
13. Colovic MD, Jankovic GM, and Wiernik PH. Hairy cell leukemia in first cousins and review of the literature. *Eur J Haematol*, 2001; 67(3): 185-8.
14. Korsmeyer SJ, Greene WC, and Waldmann TA. Cellular origin of hairy cell leukemia: malignant B cells that express receptors for T cell growth factor. *Semin Oncol*, 1984; 11(4): 394-400.
15. Korsmeyer SJ, Greene WC, Cossman J, Hsu SM, Jensen JP, Neckers LM, et al. Rearrangement and expression of immunoglobulin genes and expression of Tac antigen in hairy cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983; 80(14): 4522-6.
16. Tiacci E, Liso A, Piris M, Falini B. Evolving concepts in the pathogenesis of hairy-cell leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 2006; 6(6): 437-48.
17. Miranda RN, Cousar JB, Hammer RD, Collins RD, Vnencak-Jones CL. Somatic mutation analysis of IgH variable regions reveals that tumor cells of most parafollicular (monocytoid) B-cell lymphoma, splenic marginal zone B-cell lymphoma, and some hairy cell leukemia are composed of memory B lymphocytes. *Hum Pathol*, 1999; 30(3): 306-12.
18. Basso K, Liso A, Tiacci E, Benedetti R, Pulsoni A, Foa R, et al. Gene expression profiling of hairy cell leukemia reveals a phenotype related to memory B cells with altered expression of chemokine and adhesion receptors. *J Exp Med*, 2004; 199(1): 59-68.
19. Cleary ML, Wood GS, Warnke R, Chao J, Sklar J. Immunoglobulin gene rearrangements in hairy cell leukemia. *Blood*, 1984; 64(1): 99-104.

20. Arons E, Roth L, Sapolsky J, Suntum T, Stetler-Stevenson M, Kreitman RJ. Evidence of canonical somatic hypermutation in hairy cell leukemia. *Blood*, 2011; 117(18): 4844-51.
21. Haglund U, Juliusson G, Stellan B, Gahrton G. Hairy cell leukemia is characterized by clonal chromosome abnormalities clustered to specific regions. *Blood*, 1994; 83(9): 2637-45.
22. Falini B, Tiacci E, Liso A, Basso K, Sabattini E, Pacini R, et al. Simple diagnostic assay for hairy cell leukaemia by immunocytochemical detection of annexin A1 (ANXA1). *Lancet*, 2004; 363(9424): 1869-70.
23. Golomb HM, Catovsky D, and Golde DW. Hairy cell leukemia: a clinical review based on 71 cases. *Ann Intern Med*, 1978; 89(5 Pt 1): 677-83.
24. Catovsky D. Hairy-cell leukaemia and prolymphocytic leukaemia. *Clin Haematol*, 1977; 6(1): 245-68.
25. Westbrook CA. and Golde DW. Autoimmune disease in hairy-cell leukaemia: clinical syndromes and treatment. *Br J Haematol*, 1985; 61(2): 349-56.
26. Hasler P, Kistler H, and Gerber H. Vasculitides in hairy cell leukemia. *Semin Arthritis Rheum*, 1995; 25(2): 134-42.
27. Rosen DS, Smith S, Gurbuxani S, Yamini B. Extranodal hairy cell leukemia presenting in the lumbar spine. *J Neurosurg Spine*, 2008; 9(4): 374-6.
28. Summers TA, and Jaffe ES. Hairy cell leukemia diagnostic criteria and differential diagnosis. *Leuk Lymphoma*, 2011; 52 Suppl 2: 6-10.
29. Daniel MT. and Flandrin G. Fine structure of abnormal cells in hairy cell (tricholeukocytic) leukemia, with special reference to their in vitro phagocytic capacity. *Lab Invest*, 1974; 30(1): 1-8.

30. Golomb HM, Braylan R, and Polliack A. 'Hairy' cell leukaemia (leukaemic reticuloendotheliosis): a scanning electron microscopic study of eight cases. *Br J Haematol*, 1975; 29(3): 455-60.
31. Yam LT, Li CY, and Lam KW. Tartrate-resistant acid phosphatase isoenzyme in the reticulum cells of leukemic reticuloendotheliosis. *N Engl J Med*, 1971; 284(7): 357-60.
32. Forconi F, Sozzi E, Cencini E, Zaja F, Intermesoli T, Stelitano C, et al. Hairy cell leukemias with unmutated IGHV genes define the minor subset refractory to single-agent cladribine and with more aggressive behavior. *Blood*, 2009; 114(21): 4696-702.
33. Robbins BA, Ellison DJ, Spinosa JC, Carey CA, Lukes RJ, Poppema S, et al. Diagnostic application of two-color flow cytometry in 161 cases of hairy cell leukemia. *Blood*, 1993; 82(4): 1277-87.
34. Moller P, Mielke B, and Moldenhauer G. Monoclonal antibody HML-1, a marker for intraepithelial T cells and lymphomas derived thereof, also recognizes hairy cell leukemia and some B-cell lymphomas. *Am J Pathol*, 1990; 136(3): 509-12.
35. Cornfield DB, Mitchell Nelson DM, Rimsza LM, Moller-Patti D, Braylan RC. The diagnosis of hairy cell leukemia can be established by flow cytometric analysis of peripheral blood, even in patients with low levels of circulating malignant cells. *Am J Hematol*, 2001; 67(4): 223-6.
36. Barak V, Ginzburg M, Kalickman I, Polliack A. Serum soluble interleukin-2 receptor levels are associated with clinical disease status and histopathological grade in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 1992; 7(5-6): 431-8.
37. Mey U, Strehl J, Gorschlüter M, Ziske C, Glasmacher A, Pralle H, et al. Advances in the treatment of hairy-cell leukaemia. *Lancet Oncol*, 2003; 4(2): 86-94.
38. Else M, Ruchlemer R, Osuji N, Del Giudice I, Matutes E, Woodman A, 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): 2442-8.

39. Else M, Dearden CE, Matutes E, Garcia-Talavera J, Rohatiner AZ, Johnson SA, 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): 733-40.
40. Piro LD, Carrera CJ, Carson DA, Beutler E. Lasting remissions in hairy-cell leukemia induced by a single infusion of 2-chlorodeoxyadenosine. *N Engl J Med*, 1990; 322(16): 1117-21.
41. Carson DA, Wasson DB, Kaye J, Ullman B, Martin DW Jr, Robins RK, et al. Deoxycytidine kinase-mediated toxicity of deoxyadenosine analogs toward malignant human lymphoblasts in vitro and toward murine L1210 leukemia in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980; 77(11): 6865-9.
42. Hoffman MA, Janson D, Rose E, Rai KR. Treatment of hairy-cell leukemia with cladribine: response, toxicity, and long-term follow-up. *J Clin Oncol*, 1997; 15(3): 1138-42.
43. Saven A, Burian C, Koziol JA, Piro LD. Long-term follow-up of patients with hairy cell leukemia after cladribine treatment. *Blood*, 1998; 92(6): 1918-26.
44. Cheson BD, Sorensen JM, Vena DA, Montello MJ, Barrett JA, Damasio E. Treatment of hairy cell leukemia with 2-chlorodeoxyadenosine via the Group C protocol mechanism of the National Cancer Institute: a report of 979 patients. *J Clin Oncol*, 1998; 16(9): 3007-15.
45. Goodman GR, Burian C, Koziol JA, Saven A. Extended follow-up of patients with hairy cell leukemia after treatment with cladribine. *J Clin Oncol*, 2003; 21(5): 891-6.
46. Seto S, Carrera CJ, Kubota M, Wasson DB, Carson DA. Mechanism of deoxyadenosine and 2-chlorodeoxyadenosine toxicity to nondividing human lymphocytes. *J Clin Invest*, 1985; 75(2): 377-83.
47. Spiers AS, Moore D, Cassileth PA, Harrington DP, Cummings FJ, Neiman RS, et al. Remissions in hairy-cell leukemia with pentostatin (2'-deoxycoformycin). *N Engl J Med*, 1987; 316(14): 825-30.

48. Johnston JB, Glazer RI, Pugh L, Israels LG. The treatment of hairy-cell leukaemia with 2'-deoxycoformycin. *Br J Haematol*, 1986; 63(3): 525-34.
49. Cassileth PA, Chevart B, Spiers AS, Harrington DP, Cummings FJ, Neiman RS, et al. Pentostatin induces durable remissions in hairy cell leukemia. *J Clin Oncol*, 1991; 9(2): 243-6.
50. 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.
51. Schwarzmeier JD, Hilgarth M, Nguyen ST, Shehata M, Gruber G, Spittler A, et al. Inadequate production of hematopoietic growth factors in hairy cell leukemia: up-regulation of interleukin 6 by recombinant IFN-alpha in vitro. *Cancer Res*, 1996; 56(20): 4679-85.
52. Ratain MJ, Golomb HM, Vardiman JW, Westbrook CA, Barker C, Hooberman A, et al. Relapse after interferon alfa-2b therapy for hairy-cell leukemia: analysis of prognostic variables. *J Clin Oncol*, 1988; 6(11): 1714-21.
53. Golomb HM and Vardiman JW. Response to splenectomy in 65 patients with hairy cell leukemia: an evaluation of spleen weight and bone marrow involvement. *Blood*, 1983; 61(2): 349-52.
54. Tallman MS, Hakimian D, Rademaker AW, Zanzing C, Wollins E, Rose E, et al. Relapse of hairy cell leukemia after 2-chlorodeoxyadenosine: long-term follow-up of the Northwestern University experience. *Blood*, 1996; 88(6): 1954-9.
55. Nieva J, Bethel K, and Saven A. Phase 2 study of rituximab in the treatment of cladribine-failed patients with hairy cell leukemia. *Blood*, 2003; 102(3): 810-3.
56. Else M, Osuji N, Forconi F, Dearden C, Del Giudice I, Matutes E, 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.
57. Kreitman RJ, Stetler-Stevenson M, Margulies I, Noel P, Fitzgerald DJ, Wilson WH, et al. Phase II trial of recombinant immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) in patients with hairy cell leukemia. *J Clin Oncol*, 2009; 27(18): 2983-90.

58. Kreitman RJ, Wilson WH, White JD, Stetler-Stevenson M, Jaffe ES, Giardina S, et al. Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies. *J Clin Oncol*, 2000; 18(8): 1622-36.
59. Ostwald TJ. and MacLennan DH. Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1974; 249(3): 974-9.
60. Mery L, Mesaeli N, Michalak M, Opas M, Lew DP, Krause KH. Overexpression of calreticulin increases intracellular Ca²⁺ storage and decreases store-operated Ca²⁺ influx. *J Biol Chem*, 1996; 271(16): 9332-9.
61. Bastianutto C, Clementi E, Codazzi F, Podini P, De Giorgi F, Rizzuto R, et al. Overexpression of calreticulin increases the Ca²⁺ capacity of rapidly exchanging Ca²⁺ stores and reveals aspects of their luminal microenvironment and function. *J Cell Biol*, 1995; 130(4): 847-55.
62. Wijeyesakere SJ, Rizvi SM, and Raghavan M. Glycan-dependent and -independent interactions contribute to cellular substrate recruitment by calreticulin. *J Biol Chem*, 2013; 288(49): 35104-16.
63. Korbelik M, Banath J, Saw KM, Zhang W, Ciplys E. Calreticulin as cancer treatment adjuvant: combination with photodynamic therapy and photodynamic therapy-generated vaccines. *Front Oncol*, 2015; 5: 15.
64. Zimmerman KA, Graham LV, Pallero MA, Murphy-Ullrich JE. Calreticulin regulates transforming growth factor-beta-stimulated extracellular matrix production. *J Biol Chem*, 2013; 288(20): 14584-98.
65. Nanney LB, Woodrell CD, Greives MR, Cardwell NL, Pollins AC, Bancroft TA, et al. Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects. *Am J Pathol*, 2008; 173(3): 610-30.
66. de Bruyn M, Wiersma VR, Helfrich W, Eggleton P, Bremer E. The ever-expanding immunomodulatory role of calreticulin in cancer immunity. *Front Oncol*, 2015; 5: 35.

67. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*, 2013; 369(25): 2391-405.
68. Cazzola M. and Kralovics R. From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2014; 123(24): 3714-9.
69. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*, 2014; 28(7): 1472-7.
70. Malcovati L, Della Porta MG, Pietra D, Boveri E, Pellagatti A, Galli A, et al. Molecular and clinical features of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Blood*, 2009; 114(17): 3538-45.
71. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*, 2014; 123(10): 1544-51.
72. Cornet E, Delmer A, Feugier P, Garnache-Ottou F, Ghez D, Leblond V, et al. Recommendations of the SFH (French Society of Haematology) for the diagnosis, treatment and follow-up of hairy cell leukaemia. *Ann Hematol*, 2014; 93(12): 1977-83.
73. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, Pacilli A, Pancrazzi A, Pieri L, et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood*, 2014; 123(10): 1552-5.
74. Tadmor T. and Polliack A. Epidemiology and environmental risk in hairy cell leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2015; 28(4): 175-9.
75. Hacioglu S, Bilen Y, Eser A, Sivgin S, Gurkan E, Yildirim R, et al. Multicenter retrospective analysis regarding the clinical manifestations and treatment results in patients with hairy cell leukemia: twenty-four year Turkish experience in cladribine therapy. *Hematol Oncol*, 2014.

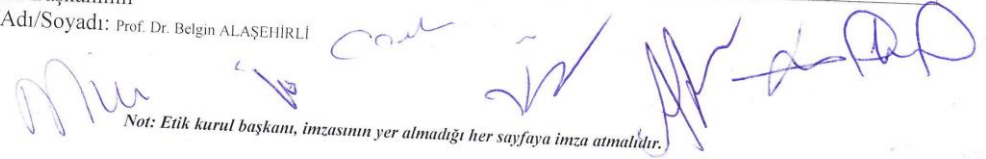
76. Chadha P, Rademaker AW, Mendiratta P, Kim B, Evanchuk DM, Hakimian D, et al. Treatment of hairy cell leukemia with 2-chlorodeoxyadenosine (2-CdA): long-term follow-up of the Northwestern University experience. *Blood*, 2005; 106(1): 241-6.
77. Lauria F, Rondelli D, Zinzani PL, Bocchia M, Marotta G, Salvucci M, et al. Long-lasting complete remission in patients with hairy cell leukemia treated with 2-CdA: a 5-year survey. *Leukemia*, 1997; 11(5): 629-32.
78. Seymour JF, Kurzrock R, Freireich EJ, Estey EH. 2-chlorodeoxyadenosine induces durable remissions and prolonged suppression of CD4+ lymphocyte counts in patients with hairy cell leukemia. *Blood*, 1994; 83(10): 2906-11.
79. Piro LD, Ellison DJ, and Saven A. The Scripps Clinic experience with 2-chlorodeoxyadenosine in the treatment of hairy cell leukemia. *Leuk Lymphoma*, 1994; 14 Suppl 1: 121-5.
80. Naik RR. and Saven A. My treatment approach to hairy cell leukemia. *Mayo Clin Proc*, 2012; 87(1): 67-76.
81. Rafel M, Cervantes F, Beltran JM, Zuazu F, Hernandez Nieto L, Rayon C, 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.
82. Maloisel F, Benboubker L, Gardembas M, Coiffier B, Divine M, Sebban C, 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.
83. Goodman GR, Bethel KJ, and Saven A. Hairy cell leukemia: an update. *Curr Opin Hematol*, 2003; 10(4): 258-66.
84. Grever M, Kopecky K, Foucar MK, Head D, Bennett JM, Hutchison RE, 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): 974-82.

85. Mercieca J, Matutes E, Emmett E, Coles H, Catovsky D. 2-Chlorodeoxyadenosine in the treatment of hairy cell leukaemia: differences in response in patients with and without abdominal lymphadenopathy. *Br J Haematol*, 1996; 93(2): 409-11.
86. Flinn IW, Kopecky KJ, Foucar MK, Head D, Bennett JM, Hutchison R, 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): 2981-6.



8. EKLER

Ek 1. Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU					
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Tüylü hücreli lösemi hastalarında kalretikülün gen mutasyonu			
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		216			
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu			
	AÇIK ADRESİ:	Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimler Fakültesi 2. Kat Şehitkamil/Gaziantep			
	TELEFON	0342 360 07 53 / 77704			
	FAKS	0342 360 39 27			
	E-POSTA	gaunetikkurul@gmail.com			
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Mehmet Yılmaz			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Hamatoloji .B.D			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hamatoloji .B.D			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
FAZ 4		☐			
Gözlemsel ilaç çalışması		☐			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		☐			
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		☐			
İlaç dışı klinik araştırma		☐			
Diğer ise belirtiniz :					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
ERLİ EN DİĞE R BEL GEL	Belge Adı			Açıklama	
	SIGORTA	☐			
Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Belgin ALAŞEHİRLİ					
İmza:					
					
Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.					

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Tüylü hücreli lösemi hastalarında kalretikülün gen mutasyonu saptanması ve prognozla ilişkisi	
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		216	
KARAR BİLGİLERİ	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	ILAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☐	
	Karar No:2015 /216	Tarih: 10.08.2015	
Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr.Belgin ALAŞEHİRLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza
Prof. Dr.Belgin ALAŞEHİRLİ	FARMAKOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof. Dr.Ercan SIVASLI	PEDİATRİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof.Dr. Mehmet KESKİN	PEDİATRİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof. Dr Feridun IŞIK	GÖĞÜS CERRAHİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. İlker SEÇKİNER	ÜROLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Ramazan BAL	FİZYOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç. Dr. Bünyamin KISACIK	İÇ HASTALIKLARI	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç.Dr. Yasemin ZER	MIKROBİYOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç.Dr.Seval KUL	BIYOİSTATİSTİK	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Yrd. Doç. Dr Betül TAŞ	AĞIZ DIŞ ve ÇENE CERRAHİSİ	Gaziantep Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Uzm.Dr. Cahide Elif ORHAN	FARMAKOLOJİ	Gaziantep İl Sağlık Müdürlüğü	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Eyüp ÇELİK	AVUKAT	Gaziantep Barosu	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
İrem ELBEYLİ	MİMAR	Gaziantep Büyükşehir Belediyesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının

Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Belgin ALAŞEHİRLİ

İmza:

Elden teslim aldım.

Salih SUZARLI

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

