



**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HEMATOLOJİ BİLİM DALI**

**KLİNİĞİMİZDE TAKİP EDİLEN
KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİLİ HASTALARIN
GENEL DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZM. DR. ANT UZAY
YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

İSTANBUL – 2009



**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HEMATOLOJİ BİLİM DALI**

**KLİNİĞİMİZDE TAKİP EDİLEN
KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİLİ HASTALARIN
GENEL DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Uzm. Dr. ANT UZAY
YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

Danışman: Prof. Dr. MAHMUT BAYIK

İSTANBUL – 2009

ÖNSÖZ

Hematoloji ihtisasım boyunca bana desteklerini esirgemeyen eşim Bahar'a, bana mutluluk kaynağı olan kızım Deniz'e ve aileme öncelikle teşekkür ederim...

Bana Hematoloji'yi öğreten ve bana ''babalık'' yapan hocam Prof. Dr. Mahmut Bayık'a ve desteklerinden dolayı Prof. Dr. Tülin Fıratlı Tuğlular'a sonsuz şükranlarımı sunarım. Çalışma hayatımda her zaman yanımda olan Dr. Işık Kaygusuz'a ve Dr. Cafer Adıgüzel'e, çalışmanın istatistiklerini yapan Dr. Tayfur Toptaş'a ve katkılarından dolayı Prof. Dr. Emel Demiralp'e çok teşekkür ediyorum.

ÖZET

Kronik Lenfositik Lösemi, ileri yaş grubunda, en sık görülen kanser türüdür. Dünya çapında yapılan birçok çalışmalarda, bu hastalığın seyrini önceden belirleyebilen, farklı prognostik belirteçler tanımlanmıştır.

Klinikte en sık kullanılan prognostik belirteçler, yaş, cinsiyet, Rai ve Binet evreleme sistemleri, immünofenotipik belirteçler ve sitogenetik özelliklerdir.

Çalışmamızda, kliniğimizde takip edilen 74 KLL hastasının, prognostik belirteçlerinin, hastalık seyri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hastaların, toplam sağ kalım, tedaviye kadar geçen zaman, tedaviye yanıt ve remisyon süreleri incelenmiştir.

Prognostik belirteçlerden özellikle, KLL hücrelerin eksprese ettiği bazı hücre yüzey antijenleri araştırılmıştır. Bunlardan, ZAP-70 ve CD38 gibi prognostik önemi iyi bilinen yüzey antijenlerin yanı sıra, yeni tanımlanmış olan CD49d proteini de incelenmiştir.

Çalışma, geriye dönük olarak, Hematoloji polikliniğinde kayıtlı olan hasta dosyalarındaki tıbbi kayıtlar üzerinden yapılmıştır.

Araştırmamızda, prognostik önemi belirlemek amacıyla, tek değişkenli ve çok değişkenli korelasyon analizler ile, hastalık ile ilgili ölçütler incelenmiştir.

Çalışmanın sonucunda, yaş, cinsiyet ve mutlak lenfosit sayısının, toplam sağ kalım ve tedaviye kadar geçen zaman üzerinde etkisi olmadığı saptanmıştır.

İmmünolojik belirteçlerden CD49d ve ZAP-70 ekspresyonun, tedaviye kadar geçen zaman üzerinde ters orantılı etkileri olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, CD49d eksprese eden hastaların tedaviye kötü yanıt verdiği gözlenmiştir.

Araştırmamızda CD38 ekspresyonun hastalık prognozu üzerinde etkisi bulunamamıştır.

Rai evreleme sistemine göre baktığımızda ise, ileri evre hastaların tedaviye kadar geçen zamanın ve toplam sağ kalımlarının kısa olduğu görülmüştür.

Çalışmada toplanan bazı verilerin dağılımı uygunsuz olması ve sitogenetik incelemelerin az olmasına rağmen, ülkemizde KLL üzerinde yapılan ilk multiparametrik prognostik araştırma olması nedeniyle, çıkan sonuçların yapılacak olan yeni çalışmalara ışık tutacağını ümit etmekteyiz.

SUMMARY

Chronic Lymphocytic Leukemia is the most common malignancy in the elderly. There are many, well defined prognostic markers which predict the course and the outcome of the disease.

The most commonly used, prognostic markers in general practice are, age, gender, Rai and Binet stage, immunophenotypical and cytogenetic markers.

In this study, we have investigated the predictive value of some prognostic parameters in 74 CLL patients.

We investigated the effect of the prognostic parameters on patients' overall survival, time to treatment, response to chemotherapy and remission free survival. In this study special emphasis was given to some cell surface antigens expressed in CLL.

Besides well known immunophenotypic markers as ZAP-70 and CD38, a newly described surface antigen CD49d was also included as a prognostic parameter.

This study is retrospective, descriptive study based on the medical records of the patients followed up in our hospital's Hematology department.

After obtaining patients' data, univariate and multivariate correlation based statistic analyses were performed in order to estimate the predictive value of the prognostic parameters.

At the end of the study, there was no correlation between age, gender and absolute lymphocyte count and overall survival with time to treatment. The expression of CD49d and ZAP-70 was inverse proportional to time to treatment. Interestingly we found that, patients expressing CD49d were more resistant to initial chemotherapy regimens. CD38 expression had no effect on overall survival and time to treatment.

There was direct and strong inverse correlation between Rai stage and time to treatment and overall survival.

Despite some insufficient data and lack of cytogenetic analyses, our study revealed the profile of Turkish CLL patients. We also found the negative effect of CD49d on treatment which was not described before, but it still has to be proven by new studies.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfalar</u>
Önsöz -----	i
Özet -----	ii
İngilizce Özet -----	iii
1.GİRİŞ VE AMAÇ-----	1
2.GENEL BİLGİLER-----	2
2.1 Patofizyoloji -----	3
2.1.1 Predispozan faktörler -----	3
2.1.2 Hücre kaynağı -----	4
2.1.3 Apoptozdaki anomaliler -----	5
2.1.4 Hücre bölünmesindeki anomaliler -----	10
2.1.5 Genomdaki anomaliler -----	11
2.1.6 KLL gelişiminde sitokinlerin rolü -----	16
2.2. KLL’de klinik bulgular -----	18
2.3. Laboratuvar bulguları -----	19
2.3.1 Periferik kan bulguları -----	19
2.3.2 Kemik iliği ve lenf nodu bulguları -----	20
2.3.3 İmmünotipleme bulguları -----	21
2.4. KLL’de tanı -----	24
2.5. KLL’de tanısal araştırmalar ve evreleme -----	25
2.5.1 KLL’de tanısal araştırmalar -----	25
2.5.2 KLL’de evreleme -----	25
2.6. KLL’de prognostik faktörler -----	27
2.6.1 Rai ve Binet evreleme sistemleri -----	28
2.6.2 Yaş ve cinsiyet -----	29
2.6.3 Lenfosit özellikleri -----	29
2.6.4 İmmün belirteçler -----	30
2.6.5 Moleküler genetik ve sitogenetik özellikler -----	31
2.6.6 Kemik iliğın histolojik özellikleri -----	33
2.6.7 Serum belirteçleri -----	34

3. ÇALIŞMANIN ARAÇ VE YÖNTEMLERİ	34
3.1. Çalışmanın yöntemi	34
3.2 Çalışmada kullanılan araçlar	35
3.3. İstatistiksel yöntemler	36
4. BULGULAR	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
6. KAYNAKLAR	73

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik Lenfositik Lösemi, genelde yavaş seyirli ancak henüz kesin tedavisi olmayan bir hastalıktır. Batı toplumlarında ileri yaş grubunda en sık görülen kanser türü olup, yaşlı toplum sağlığı üzerinde önemli tanı ve tedavi yükü oluşturmaktadır. KLL de hastalığın seyri ve prognozu hakkında önemli veriler sağlayan birçok klinik, sitogenetik ve immunolojik değişken mevcuttur. İmmunolojik olarak akım sitometri ile saptanabilen ve hastalığın prognozu üzerinde net etkisi olan ZAP-70, CD38, *IgVH* ve CD49d gibi birçok lenfosit yüzey proteini tanımlanmıştır.

KLL lenfositlerinin hücre yüzey proteinleri, hücre apoptozunu, migrasyonunu, hücreler arası iletişimi ve küme oluşturma görevlerini üstlenirler. Bunların içinde, mikroçevre ile iletişimini sağlayan, sitokinlerin etki alanı olan ve endotel ile fibronektin bağlantısını sağlayan CD49d yüzey proteini klinik olarak büyük önem taşımaktadır.

CD19+ hücrelerin yüzeyindeki CD49d proteinin yüksek oranda eksprese olması, henüz tedavi almamış olan hastalarda toplam sağ kalımı ve tedaviye kadar geçen süreyi oldukça kısaltmaktadır. Ancak tedavi ihtiyacı olan CD49D+ ve CD49D- hastalar arasındaki klinik seyrin farklı olup olmadığı, tedaviye yanıt oranlarının değişip değişmediği ve remisyon sürelerinin arasındaki fark henüz net olarak bilinmemektedir.

Bunun dışında CD49D nin diğer prognostik belirteçler ile birlikte (evre, ZAP-70, sitogenetik özellikler) çoklu değişken olarak KLL nin genel seyri üzerindeki etkisini araştıran çalışmaların sayısı oldukça azdır.

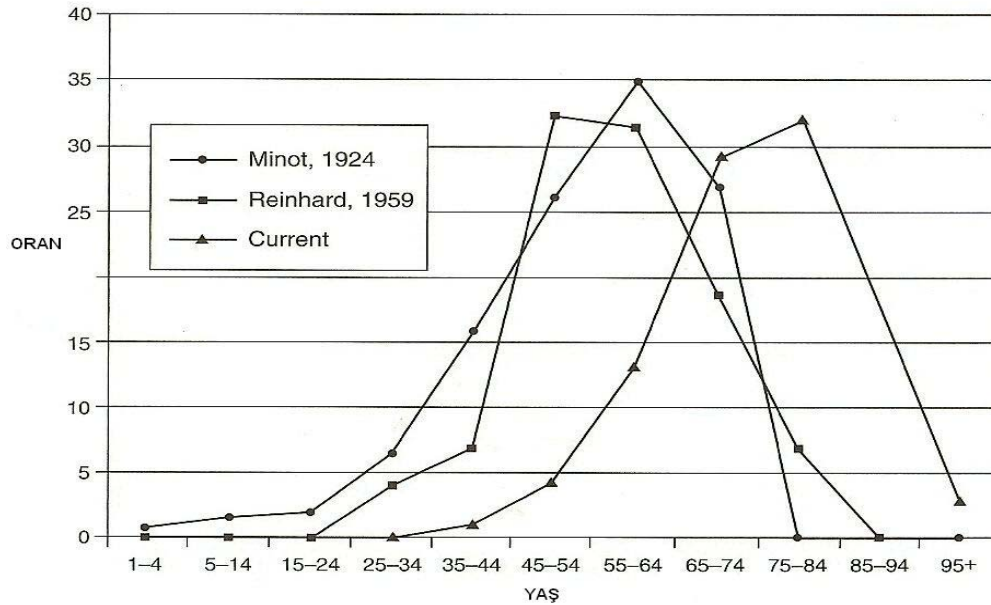
Çalışmanın amacı, Marmara Üniversitesi Hastanesi Hematoloji bölümünde takip edilmiş olan tüm KLL vakalarının klinik, sitogenetik, immunolojik ve demografik özelliklerinin, geriye dönük olarak değerlendirilip, bu değişkenlerin, hastaların, sağkalım, hastalıksız sağ kalım ve tedaviye yanıtlarının üzerindeki etkilerinin belirlenmesidir.

Kliniğimizde takip edilen tüm KLL hastaların CD49d oranları ile birlikte diğer prognostik faktörleri de katarak, bu yüzey proteinin tekli ve çoklu değişken analizleri ile toplam sağ kalım (OS), tedaviye kadar geçen zaman(TTT), tedaviye yanıt(CR, PR, RR) hastalıksız sağ kalım (PFS) üzerindeki etkileri araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Kronik lenfositik lösemi (KLL), olgun görünümlü, çoğalmayan lenfositlerin, kanda, kemik iliğinde, lenf nodlarında ve dalakta birikmesi ile ortaya çıkan klinik tablodur. KLL hücreleri monoklonal B lenfositlerdir ve CD5 ile CD23 (+) olmaları sadece kendilerine has özelliklerdir(1–3). Yeni bulgulara göre, bu tümör hücreleri, bellek B hücrelerinden köken aldığı anlaşılmıştır. Hücre morfolojisi, fenotipik ve moleküler genetik özellikler KLL de büyük değişkenlik gösterir ve bundan dolayı hastalar arasında prognoz açısından farklılıklar doğar (4–6).

KLL insidansı dünya genelinde değişkendir, en sık Kuzey Amerikada görülürken en az Uzak Doğu ülkelerinde görülür. Kuzey Amerika’da, KLL, tüm lösemilerin %22,6’nı oluşturur. Yıllık insidansı erkeklerde 3,35–3.69.100000, kadınlarda ise 1,69–1.92.100000 dir (7,8). Aslında, hastaların çoğu akım sitometri ile tanı konduktan sonra tedavisiz izlendiklerinden dolayı, KLL’nin insidansı bildirildiğinden daha yüksek olabileceği rapor edilmiştir (9). Hastalık gençlerde nadir görülür, ancak 40 yaşından itibaren insidans hızla artmaya başlar. Tanıda ortalama yaş 69,9 dur ve hastaların %80 den fazlası 60 yaşından büyüktür (7) (şekil.2,1). Tüm bu bilgilerin yanı sıra, diğer Non-Hodgkin lenfomaların aksine, son 30 yılda KLL insidansında artış gözlenmemiştir.



Şekil 2,1. Kronik Lenfositik Lösemide yaş dağılımı

2.1. PATOFİZYOLOJİ

2.1.1. Predispozan Faktörler

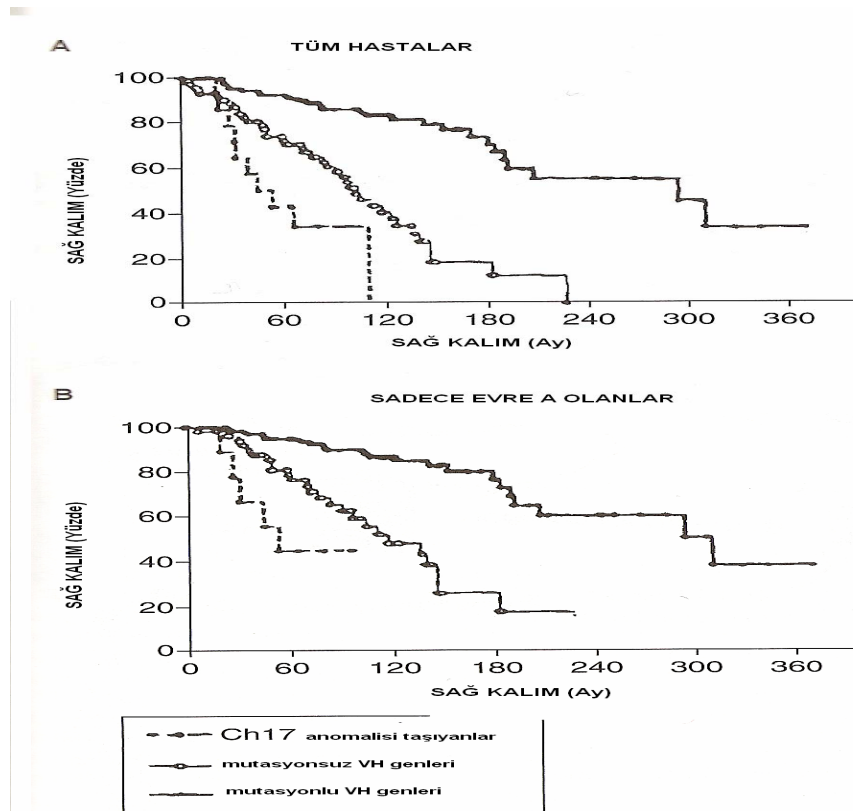
Diğer lösemilerin aksine, KLL de çevre ve meslek ile ilgili risk faktörlerin, hastalık insidansı üzerine olumsuz etkileri bildirilmemiştir(8). Aile öyküsü KLL de önemli bir risk faktörü olarak düşünülmektedir. Yapılan araştırmalara göre, KLL hastaların onda birinde, ailesinde KLL veya diğer lenfoproliferatif hastalıklar olduğu bildirilmiştir (10). KLL hastaların birinci derece akrabalarında KLL gelişme riski 30 kat fazladır(8,10–12). Ayrıca birinci derece akrabaların %13,5 de, periferik kan lenfositlerinde KLL ye özgü immünojenotipik özellikler saptanmaktadır (13). Bu bulgulara rağmen bu kişilerde KLL gelişip gelişmeyeceği henüz net bilinmemektedir (13). Ailesel KLL hastaları, sporadik KLL hastalara göre ortalama 10 yaş daha gençtir (11) ve ebeveynlerinin tanı aldıkları yaşa göre çocukların tanı alma yaşı ortalama 15–20 yıl daha erkendir(14–17). Bu vakalardaki kalıtım şekli bilinmemekle beraber, HLA tipi ile ilişkili değildir (18).

Sporadik KLL nin iki formu vardır: imünooglobulin genin değişken bölgesinde (*IgV*) somatik hipermutasyonu olanlar ve olmayanlar. Ailesel KLL ile sporadik KLL de *IgV* gen mutasyonu insidansları arasında fark olup olmadığı tartışmalıdır (19,20).

DNA çift sarmal kırıkların oluşmasıyla, ataksi telenjiektazi mutasyon geni (ATM) ya DNA onarımını veya apoptozu başlatır. Bu etkilerin bir kısmı, ATM tarafından fosforile edilen p53 aracılığıyla oluşmaktadır (21). ATM geni, lenfosit gelişiminde önemli yer aldığından dolayı, ataksi telenjiektazi hastaları özellikle T hücre lenfoid maligniteleri açısından büyük risk altındadır (21–24). Son araştırmalarda KLL hastaların üçte birinde ATM geninde mutasyon veya delesyon saptanmıştır (22,23). Bu vakalar *IgV* gen mutasyonu taşımamaktadır ve pregerminal hücre kaynaklıdır (24). Hastalardaki ATM mutasyonları aynı zamanda germ seri hücrelerinde de gözleendiğinden, heterozigot ATM gen mutasyonları çocuklarında da devam eder. Bu kalıtsal geçiş, kişilerin ailesel KLL ye yatkınlığı kısmen açıklamaktadır (22–25).

2.1.2. Hücre kaynağı

KLL hücresinin kaynağı hakkında tartışmalar devam etmektedir (26). KLL hücresi CD5(+) olması nedeniyle, mantle zonda yer alan CD5(+) B lenfositlerinden kaynaklandığı düşünülüyordu (1.26.27). Ancak normal CD5(+) B lenfositlerde *IgV* gen mutasyonu yoktur, hâlbuki KLL hücrelerinde bu mutasyon %50 vakada olduğu bilinmektedir (29,31). Bu bulgulara dayanarak, iki farklı KLL hücresi olduğu anlaşılmıştır. Birincisi pregerminal lenfositten köken alır ve *IgV* mutasyonu taşımamaktadır, ikincisi ise germinal merkezden geçmiştir ve mutasyonlar içerir (32). Bu iki farklı KLL hücre tipi, kendine özgü farklı genetik anomaliler içerir ve prognozları da farklıdır (29,31). Genetik mutasyonlar içeren hücrelerde (*IgV*+) 13q14 delesyonu daha sık görülmekte ve bunlarda prognoz daha iyidir. Bunun yanı sıra genetik mutasyon içermeyen hücrelerde (*IgV*-) sıklıkla trizomi 12 rastlanmakta ve prognoz oldukça kötüdür (şek.2,1) (29,31).



Şekil 2.1. *IgV* mutasyonuna bakılmaksızın, p53 mutasyonu taşıyan hastaların (Ch17), p53 taşımayanlara göre sağ kalımı. **A:** Tüm hastalar. **B:** Evre A hastaları

Son dönemde KLL'nin genetik ekspresyon profili *DNA microarray* yöntemi ile araştırılmaya başlanmıştır (5,6). Klein ve arkadaşları tarafından 12000 gen araştırılmıştır (5). Sonuçlara göre, 16 mutasyona uğramış ve 18 mutasyona uğramamış KLL vakalarında, çoğu gende ortak ekspresyon şekli tespit edilmiş olmasına rağmen, 23 gende, iki grup arasında farklı ekspresyonlar olduğu görülmüştür. *Naive B*, *germinal*, *CD5(+)* ve bellek hücreleri ile karşılaştırıldığında, KLL hücreleri en çok bellek hücreleri ile benzerlik gösterirler (5). *Lymphochip complementary DNA microarray yöntemi*ni kullanarak Rosenwald ve arkadaşları 37 vakada benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Bu çalışmada, *IgV+* hücreler *IgV-* hücrelerden 175 farklı gen ekspresyonu ile farklı bulunmuştur. Bu farklı gen ekspresyonlarından 56 tanesini kullanarak 10 vakada hatasız olarak *IgV+* veya *IgV-* oldukları tespit edilebilmiştir. İki grup arasında farkı en doğru tespit edebilen gen ekspresyonu ZAP-70'tir. Bu kinaz öncelikle T hücrelerinde eksprese edilir ve T hücre reseptöründeki sinyallerin iletilmesinden sorumludur. *RT-PCR* yöntemi kullanarak, mutasyona uğramamış hücrelerde daha yüksek düzeyde ZAP-70 mRNA olduğu doğrulanmıştır.

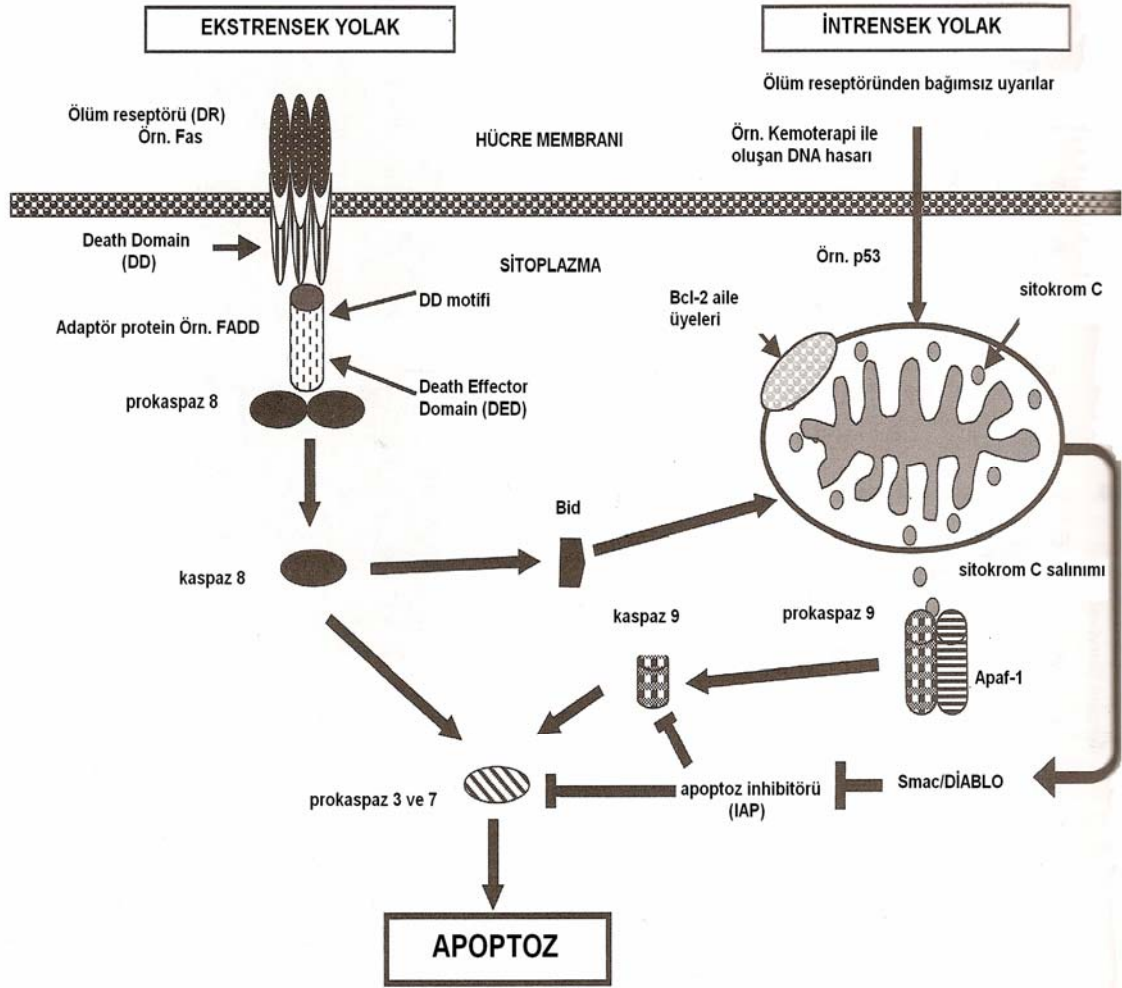
Bahsi geçen bu çalışmaların sonucunda, KLL hücrelerinin, *CD5(+)*, *naive B* veya foliküler merkez hücrelerinden köken almadıkları anlaşılmıştır. KLL hücrelerindeki *CD5* ve *CD23* ekspresyonu, hücre aktivasyonu veya kansere ikincil olarak gelişen ve özellik taşımayan değişiklikler sonucu gelişmiş olabilir. KLL'nin köken aldığı hücre, *IgV+* olsun veya olmasın, bellek B hücresi olduğu düşünülmektedir. Bu tez, KLL hücrelerin neden genellikle *CD27(+)* (*bellek B hücre belirteci*) olduklarını açıklamaktadır (33,35). Çoğu normal *CD27(+)* hücrelerde *IgV* mutasyonlarına rastlamak mümkündür, ancak bazılarında bu mutasyon gözlenmez (36,37). Buna göre KLL hücrelerin iki farklı *CD27(+)* hücre türünden köken aldığı söylenebilir – *IgV+* ve *IgV-* bellek B lenfositlerinden.

2.1.3. Apoptozdaki anomaliler

KLL deki temel patoloji, hücre çoğalması değil hücre birikimidir. Bunu ilk kez, 35 yıl önce yaptıkları araştırmalarda, Galton ve Dameshek bildirmişlerdir (38,39). Son yıllarda KLL deki bu özelliğin, apoptoz yollarında meydana gelen bazı bozukluklardan kaynaklandığı anlaşılmıştır. KLL hücrelerinin büyük bölümü uzun ömürlü, hücre döngüsüne ve G0 fazına girmeyen, hücreler olduğu tespit edilmiştir. Hücre birikimini idame ettirecek çok az sayıda hücrenin varlığı KLL hastalığının

sürekliliğini mümkün kılmaktadır. Ayrıca apoptozu indükleyen kemoterapi ajanların, bazı KLL hücre grupları üzerindeki etkisizliği, bu hücrelerde apoptoz yollarında meydana gelen bozukluklar sonucunda geliştiği anlaşılmıştır (40,42).

Apoptozun oluşması, birer sistin proteaz olan, kaspazların etkin hale gelmesiyle başlar. Bu kaspazlar, diğer kaspazları aspartik asit kalıntılarında serbestleştirir ve böylece onları birer aktif enzime dönüştürürler (40–42) (Şek.2,2).



Şekil 2,2. Kronik Lenfositik lenfomada apoptoz yolları

Apoptozun iki ana yolağı

Mitokondrial/sitokrom c – intrinsek yolak: DNA hasarı ile başlar. Bunun sonucunda p53 eksprese edilir ve bax: bc-2 oranı artar. Ardından mitokondrinin iç ve dış membranından sitoplâzmaya doğru sitokrom c salınımı başlar. Sitoplazmada, sitokrom c , Apaf-1 (*apoptosis activating factor*), ile brleşir ve onu etkin hale getirir. Bu süreç dATP'nin sitoplâzmada bulunmasını gerektirir.

Apaf-1'in N terminali prokaspaz 9' a bağlanır ve onu etkinleştirir, ardından kaspaz 3 etkin hale gelir (43). Sitokrom c/ mitokondrial sistem, kemoterapinin etkinliğı için çok önemlidir, bu yüzden Apaf-1'in eksikliğı, ilaç direncine neden olur (43). Son yıllarda, KLL 'deki farklı Apaf-1 düzeyleri, kemoterapiye olan duyarlılığın üzerinde nasıl bir etkisi olduğı, birçok çalışmada halen araştırılmaktadır (45).

Fludarabin ve Kladrinin'in trifosfat bölümleri, dATP'nin yerini alabilir, böylece sitotoksik etkilerinin bir kısmı, Apaf-1'in bağlanması ve kaspaz 9 ile 3'ün etkinleşmesiyle açıklanabilir (46,47).

Bunun dışında mitokondriden, Smac/DİABLO salınımı da olur ve sonuç olarak apoptozu baskılayan proteinler inhibe edilir.

Tumör nekroz faktör ölüm reseptörü – TNF-DR; ekstrinsik yolak: Apoptozdaki diğer önemli yolaktır. Şu ana kadar keşfedilmiş olan altı ölüm reseptörü (DR) vardır. Bunlar içinde, TNF reseptörü, Fas (APO-1 ve CD95) ve DR4/DR5 (TNF'ye bağlı apoptoz indüksiyonundan sorumlu reseptörler –TRAIL), en çok bilinenlerdir. Bu reseptörlere ligand bağlandığında, sitoplâzma içindeki bölgelerine (*death domain*), Fadd/Mort-1 gibi adaptör proteinler bağlanır ve böylece reseptör kompleksi tamamlanmış olur. Adaptör proteinlerin iki önemli bölgesi vardır: *death domain* 'e bağlanan bölge ve sitoplâzmaya uzanan *death effector domain* (DED) bölgesi. TNF reseptörüne bağlandığında, DED, kaspaz 8 ve 10'a da bağlanır ve onları etkin hale getirir (43). Bu şekilde başlayan apoptozun sürekliliğı, reseptörün varlığına ve DED'e kaspazların yerine bağlanabilen birçok inhibitör proteinin sitoplâzma içinde bulunmasına bağlıdır. Bunlardan biri FLICE inhibitör proteindir. Bu protein prokaspaz 8 in benzeridir ve iki adet DED bağlanma bölgesi içermesine rağmen proteolitik etkinlikten yoksundur (48).

İnternsek ve Ekstresek yolaklar arasında sürekli bir etkileşim mevcuttur. Bu şekilde, kaspaz 8, Bid'i etkinleştirebilir ve mitokondriden sitokrom c salınımını

başlatabilir (42,49). Alternatif olarak, kemoterapi veya radyasyon sonucu aktif hale gelen internsek yolak da, kaspaz 3 üzerinden kaspaz 8'i aktif hale getirebilir (50,51). TNF reseptörleri aracılığı ile başlatılan apoptoz, lenfoid hücre nüfusunun kontrol edilmesinde önemli rol oynar. Fas ligand ve reseptörlerde meydana gelen bozukluklar, splenomegali ve lenfadenopati ile seyreden otoimmün lenfoproliferatif hastalıkların ve lenfomaların gelişmesi için risk oluşturur.

Fas ligand, normalde, aktive lenfositlerde yüksek oranda etkin halde bulunur, ancak KLL hücreleri Fas ligandın etkilerine karşı duyarsızdır. Yapılan çalışmalarda, İL-2 ve *staphylococcus aureus*'tan elde edilen protein A ile Fas ligand seviyeleri artırılmasına rağmen KLL hücrelerinde apoptotik aktivite elde edilememiştir (50-53).

DR4 ve DR5 reseptörleri KLL hücre yüzeyinde bulunmalarına rağmen, bu hücrelerin TRAIL'e olan duyarlılıkları tartışmalıdır (54,55). KLL hücreleri hem TRAIL hem de Fas ligand sekrete eder, böylece normal T hücrelerini baskılayabilir ve hastalıkta görülen immün baskılanma bu şekilde oluşabilir (54-56).

TNF ligandları arasında etkileşim sonucu, doğrudan başlatılan apoptozun yanı sıra, TNF reseptörleri kemoterapi ajanların etkinliği üzerinde de önemli rol oynar. Kemoterapi ajanları, Fas veya DR4/DR5 reseptörlerini arttırabilir böylece, hücrenin kendiliğinden Fas ligand ve TRAIL düzeylerini apoptozu başlatacak şekilde ayarlanmasını sağlayabilirler (57-60). Yapılan çalışmalarda Fludarabin'in ve Klorambusil'in *in-vitro* olarak Fas mRNA'sını arttırdıkları ancak, Fas protein düzeylerini etkilemedikleri gösterilmiştir (50). Diğer yandan radyasyonun Fas protein düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir, ancak hiçbir tedavi yöntemi, KLL hücrelerini Fas liganda karşı duyarlılaştıramamaktadır.

Apoptoz yolaklarının denetimi

Apoptozdaki yolaklar, çok farklı proteinler tarafından denetlenmektedir. KLL'de bazı proteinlerin denetim işlevinde bozukluk mevcuttur. *Bcl-2* ailesi yaklaşık 20 farklı proteinden oluşmaktadır. Bunların bazıları apoptozu etkinleştirir, diğerleri ise baskılar. Bu proteinler, hücre membranında, çekirdek zarında ve mitokondri membranında bulunur. Sitoplâzmadaki diğer proteinlere bağlanırlar ve hücre geçirgenliğini değiştirerek, mitokondriden sitokrom *c* salınımını denetlerler. *Bcl-2* ailesine ait bazı proteinler apoptozu arttırırken (örn. *bax*, *bcl-x*, *bak* ve *bad*),

bazıları da onu inhibe eder (örn. *bcl-2*, *bcl-xl* ve *mcl-1*) (61,67). KLL hücreleri yüksek oranda *bcl-2*, *bax* ve *bak* içerirken, *bcl-xl* ve *bad* düzeyleri oldukça düşüktür. *Bcl-2*'nin yüksek oranda eksprese edilmesi, translokasyonlardan çok, DNA'nın hipometilasyonu sonucu gelişir, bu özellik, KLL hücrelerinin uzun ömürlü olmasını kısmen açıklar (61). Yüksek oranda *bcl-2* içeren KLL hücrelerin in vitro olarak daha uzun sağ kalımları vardır. Anti sense oligonükleotidler aracılığı ile azaltılan *bcl-2* düzeyleri, sonuç olarak hücre apoptozunu indükler (66).

Bax: *bcl-2* oranı KLL hücrelerin ilaç duyarlılığı ile yakından ilişkilidir (67). KLL'de *mcl-1* protein düzeyleri değişken olmalarına karşın, yüksek oranda bulunması, tedaviye direnç ile ilişkilidir.

Transkripsiyon faktörü olan NF- κ B, birçok antiapoptotik genin ekspresyonunu arttırarak, apoptozun baskılanmasını sağlar (68,69). NF- κ B, I κ B tarafından bağlanarak, hücre çekirdeği içine girmesi engellenir. I κ B fosforillenerek, ubiquitine bağlanırsa, oluşan kompleks proteazom tarafından parçalanır ve etkisi ortadan kalkar, böylece NF- κ B aktif hale gelir. KLL hücrelerinde NF- κ B düzeyi yüksektir ve özellikle CD40 ligandın uyarılması sonucunda daha da yükselir. Bu transkripsiyon faktörü KLL hücrelerinde, apoptozun inhibe edilmesinde ve hücre yaşam süresinin uzatılmasında, önemli rol oynar (70). Yapılan araştırmalarda, proteazomun, laktasilin, MG132 ve bortezomib tarafından baskılanması sonucunda, KLL'de hücre ölümü meydana gelirken normal lenfositlerde bu etki gözlenmemiştir (71,73). Hücre ölümü, sitokrom *c*/mitokondri yolağı üzerinden gerçekleşmektedir ve bu ilaçlar, tedaviye dirençli vakalarda kullanılabilir (71,72).

Diğer bir protein kinaz olan *Akt*, *bad*, kaspaz 9 gibi proteinleri fosforile ederek apoptozu baskılayabilir (74,75). KLL'de bu yolak özellikle otolog plazma ile belirgin olarak etkin hale gelir. Otolog plazma ortamında üretilen KLL hücre kültürlerinde, tedaviye direnç ve spontan apoptozun yokluğu, bu etki ile kısmen açıklanabilir (75).

Apoptozun kontrolünde diğer birçok protein önemli rol oynar. Tümör baskılayıcı gen olan *p53*, transkripsiyon aktivatörüdür ve 17p13 kromozomunda yer alır (42,76). Radyasyon ve alkilleyici ajanların etkisiyle meydana gelen DNA hasarı sonucunda, ATM kinaz ve DNA'ya bağımlı kinazların yardımı ile *p53* proteini fosforillenerek istikrarlı hale getirilir (76). Oluşan hasarın giderilmesi için hücre döngüsü, G1 ve G2 evresinde duraksar. Ancak onarım süreci tamamlandıktan sonra hücre S veya M evresine girer (76). Bunun yanı sıra *p53* apoptozu da başlatabilir.

Bu etki genellikle tümör hücrelerinde görülür ve kanser ilaçlarının göreceli tümör seçiciliklerini açıklamaktadır (77). KLL’de p53 mutasyonu vakaların %10-15’nde görülür ve genellikle ikinci alelin delesyonu sonucu oluşur – del17p13. Bu vakalarda yüksek lenfosit sayısı, kemoterapi ilaçlarına karşı *in vitro* ve *in vivo* direnç ve kısa sağ kalım gözlenir (şek 2.2, 2.3) (63,64,78,79). İleriye dönük yapılan araştırmalarda, zamanla p53 mutasyonu taşıyan hücrelerin sayısı giderek arttığı ve tümör hücrelerinin sağ kalımı daha da uzadığı gösterilmiştir (78).

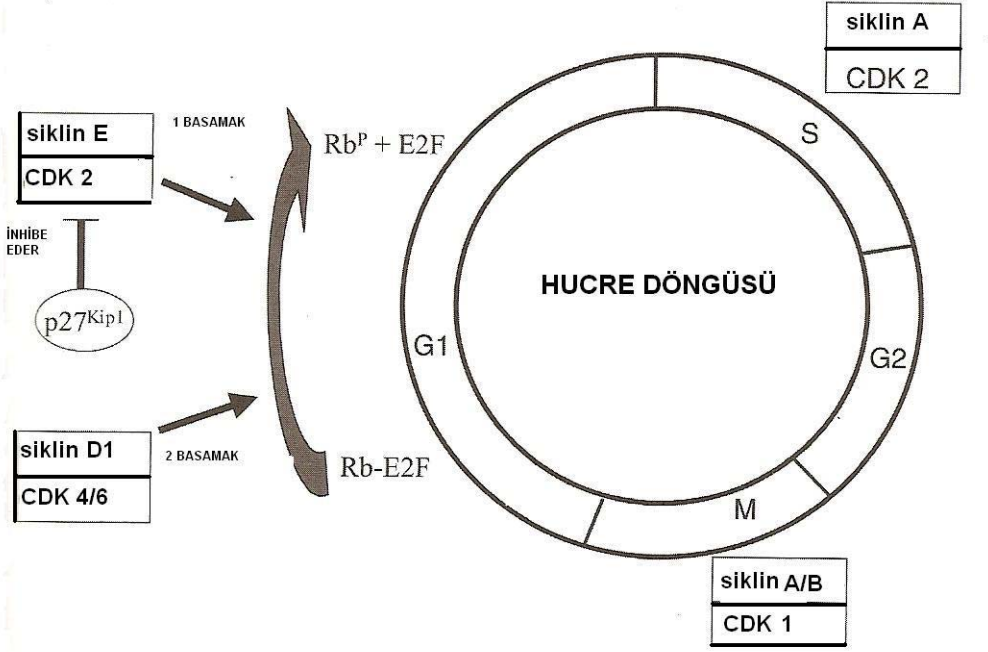
Murine double minute-2 (mdm-2) geni 12 kromozomda yer alır ve p53 tarafından etkin hale getirilir (76). *Mdm-2*, p53’ün ubiquitine bağlanmasını artırarak onun proteazom tarafından parçalanmasını sağlar (76). Bu genin fazla eksprese olması durumunda, p53’ün hücreyi G1 evresinde durdurabilme özelliği azalır, apoptozun etkin hale gelmesi yavaşlar ve tedaviye direnç gelişir (63). Genetik çalışmalarda bu etkinin gösterilmiş olmasına rağmen, KLL’de vakaların %65 ‘de gözlenen yüksek *mdm-2* ekspresyonu hastalığın seyri üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı anlaşılmıştır (80).

ATM geni 11q22–23 kromozomunda yer alır ve oluşan DNA hasarı sonucunda p53’ün fosforillenmesinden sorumludur (21,76). KLL hastaların yaklaşık %30 bu gende mutasyonlar taşımaktadır. Bu vakalarda p53 mutasyonuna benzer ilaç direnci mevcuttur (21,81–83). ATM mutasyonu *IgV-* vakalarda daha sık gözlenmesi sağ kalımı belirgin olarak kısaltmaktadır (24,29–31).

2.1.4. Hücre bölünmesindeki anomaliler

Hücresinin bölünme evreleri arasındaki geçiş siklinler ve sikline bağımlı kinazlar (CDKs) tarafından denetlenmektedir. CDK düzeyleri sabit kalırken, beş farklı siklinin düzeyleri devamlı değişkenlik gösterir, böylece uygun CDK’yı aktif hale getirerek hücre döngüsünün evreleri arasındaki geçişleri mümkün kılarlar (şek1.4) (84). Bunu dışında iki farklı CDK inhibitörü – INK4 ve Cip/Kip proteinleri, CDK aktivitesini denetleyerek hücre döngüsünde önemli rol oynar (85). Normal şartlar altında, durağan hücreler hücre döngüsüne girerken, D siklinler (D1,D2,D3) CDK4 ve 6 ile etkileşime girerek hücreyi S evresine yönlendirirler. Meydana gelen siklin D/CDK4,6 bileşimi, retinoblastoma proteinin (Rb) fosforilasyonunu başlatır ve bu süreç, siklin E/CDK2 aracılığı ile devam ettirilir. Siklin D/CDK4’ün diğer fonksiyonu da Cip/Kip inhibitörlerini ortadan kaldırmaktır (p27^{Kip1} ve p21^{Cip1}).

KLL hücreleri genelde durağan ve G0/G1 evresinde olmalarına rağmen, bu hücrelerde siklin D2 ve D3'ün ekspresyonu artmıştır (86–88). KLL hastaların %25'de ek olarak siklin D1 düzeyi de artmıştır ancak bu ekspresyon mantle hücreli lenfomada olduğu kadar belirgin değildir (90). Bu özellik, p27^{Kip1}'in fazla ekspresyonu ile açıklanabilir ve artmış lenfosit sayısı ile kısa sağ kalım ile ilişkilidir (91).



Şekil. 2.3. Hücre döngüsünün kontrolü

2.1.5. Genomdaki anomaliler

KLL' deki sitogenetik çalışmalar 1980'lerden beri yapılmaktadır. İlk dönemlerde bu çalışmalar, hücrelerin proliferatif indeksi düşük olması nedeniyle, oldukça sınırlı bilgiler sunmaktaydı (79,92). Eğer yeterince metafaz elde edilebilir ve çalışma yapılabilirse, vakaların yaklaşık %50 de genetik anomaliler tespit edilebilmektedir (79,92–105) (tablo 2.1). Geri kalan vakalardaki normal sonuçlar muhtemelen ortamdaki normal T hücrelerin yanlışlıkla incelenmesi sonucunda meydana gelmektedir (79). Klonal anomali tespit edilen vakaların %50'de bir klonal anomali saptanırken bunların yarısında da iki veya üç klon anomalisi tespit edilmektedir (94). Yeni araştırma tekniklerin yardımı ile (örn. FISH) genetik anomaliler vakaların %80'de bulunabilmektedir (79,92). Sıklıkla bu anomaliler delesyon veya anöplodi şeklindedir ve diğer düşük dereceli lenfoid kanserlerine kıyasla translokasyonlar nadirdir. FISH tekniği oldukça özgül olmasına rağmen, aranan

genetik anomalinin önceden bilinmesi gerekmektedir, bu nedenle yeni anomalilerin taranmasında pek yardımcı değildir. Kıyaslamalı genomik hibridizasyon yöntemi ile kromozom edinimi ve kaybı (örn.anöploidi) veya konvansiyonel sitogenetik ile tespit edilemeyen yeni delesyonların taranması mümkün olmaktadır (92). Mikrosatelit belirteçler ile alel tiplendirmesi (*microarray*) gibi yeni yöntemlerin gelişmesi ile KLL'nin patogenezi hakkında daha fazla bilgiler elde edilebilir (93).

Genomik anomali	Konvansiyonel sitogenetik (%)	FISH (%)	Etkilenen gen	Klinik özellikler
Normal	50	20	-	-
13q delesyonu	10	55	Rb	<i>IgV</i> gen mutasyonu – iyi prognoz
13q tek başına	5	36		
13q diğer anomaliler ile birlikte	5	19		
11q delesyonu	8	18	ATM	<i>IgV</i> mutasyonu yok, büyük LAP
Trizomi 12	13	16	mdm2	<i>IgV</i> mutasyonu yok. Atipik morfoloji, ileri evre hastalık
17p delesyonu	4	17	p53	<i>IgV</i> mutasyonu yok. PLL morfolojisi
6q delesyonu	4	6	-	-

Tablo 2,1. Kronik Lenfositik Lösemide genetik anomalilerin sıklığı ve onlarla ilgili klinik özellikler

Konvansiyonel sitogenetik ile yapılan araştırmalar

KLL'de konvansiyonel sitogenetik ile yapılan en önemli araştırma 1990 yılında *International Working Party on Chromosomes* 'un yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada toplam 604 vakanın %51'de klonal kromozom anomalileri tespit edilmiştir (şek2.4) (98,99). En sık gözlenen anomali trizomi 12 (%36), bu vakaların bir kısmında tekli olarak diğerlerinde de başka anomaliler ile birlikte tespit edilmiştir. Sıklıkla

gözlenen diğer kromozomal yapı bozuklukları 13 (%20) ve 14 (%16) kromozomlarda tanımlanmıştır (98,99). 13q kromozomundaki anomaliler genellikle 13q14 delesyonu (*Rb gen bölgesi*) ve 13q14 bölgesinde kırılma noktaları içeren translokasyonlar şeklinde bildirilmiştir. 14q kromozomundaki anomaliler de sıklıkla 11 kromozomu içeren çok farklı kromozomal translokasyonlar şeklinde görülür. Klasik olarak t(11;14)(q13;q32) translokasyonu mantle hücreli lenfomada ve nadiren de KLL'de saptanmaktadır. Bazı araştırmacılara göre KLL vakalarında bu translokasyonun gözlenmesi aslında bu vakaların yanlışlıkla KLL olarak tanımlanmalarından kaynaklanmaktadır (106). 11 kromozomundaki anomaliler genelde delesyon şeklinde olur ve vakaların %5'de gözlenir, bu bozukluk kötü prognoz ve kısa sağ kalım ile ilişkilidir (104).

Tek klon ve çoklu klonal anomalisi olan hastalarda 12 ve 13 kromozomlardaki bozukluklar eşit oranda gözlenirken, 14 kromozom anomalileri en çok poliklonal anomalili hastalarda gözlenir (94,98).

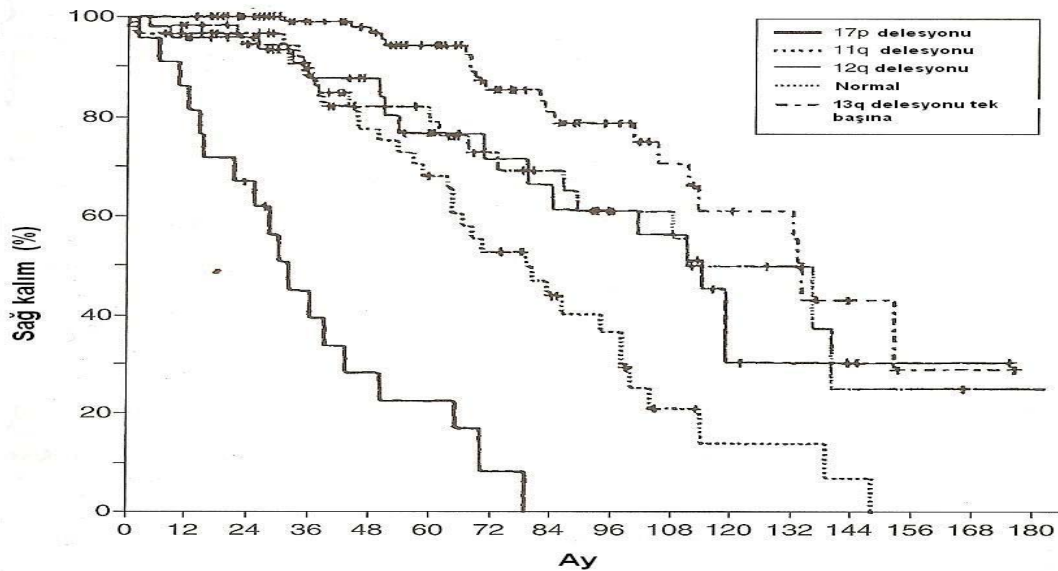
Genellikle anormal karyotipi olan hastaların, normal sitogenetik yapıdaki hastalara göre prognozları daha kötüdür. Bunların içinde en kötü prognoza sahip olan, çoklu klonal bozuklukları olan hastalardır (95–101).

Tekli kromozom anomalilerden trizomi 12 en kötü prognozludur, 13q⁺ olanlar ise normal karyotipli hastalardan farksızdır (98,99). İlginç olarak, trizomi 12, KLL'nin diğer morfolojik çeşitlerinde de görülmektedir (%15), bu nedenle KLL/PLL ve atipik KLL vakaların daha kötü seyrettiği düşünülmektedir (101,103). Tüm hastalar düşünüldüğünde, tekli veya çoklu klon bozukluklarına bakılmaksızın, en kötü prognozlu vakalar 14 kromozom anomalisi taşıyanlardır (98).

KLL'de tanımlanmış olan kromozom anomalileri erken dönemde ortaya çıkar, ek klon anomalileri hastalığın seyri esnasında gelişmiş olabileceği düşünülmektedir (98,107,108). Yapılan çalışmalarda, hastalık seyri esnasında, yeni klonal anomalilerin gelişme insidansı %16 ile %39 arasında bildirilmektedir (107,108). 11q ve 6q'de delesyonların sonradan gelişmesi, hastalığın hızla ilerlemesine neden olmaktadır (109,110).

FISH yöntemi ile yapılan araştırmalar

Konvansiyonel sitogenetik araştırma yöntemlerinin, KLL'deki kısıtlamaları nedeniyle son dönemde, bu hastalıktaki genetik bozuklukların tanımlanmasında FISH yöntemi giderek daha fazla kullanılmaktadır. Yapılan son büyük çalışmalarından bir tanesinde Döhner ve arkadaşları, 325 KLL hastası üzerinde FISH yöntemi ile kapsamlı sitogenetik araştırmalar yapmıştır. Sonuçlara göre bu hastaların 268'de (%82) genetik anomali saptanmıştır. Bunların içinde en sık 13q14 delesyonu (%55), ardından 11q22-q23 delesyonu (%18), trizomi 12q13 (%16), 17p13 delesyonu (%7) ve en az 6q21 delesyonuna (%5) rastlanmıştır (79). Buna benzer çalışmalarda bildirilmiş olan genetik anomalilerin sıklığı konvansiyonel sitogenetik ile tanımlanmış olanlardan farklıdır. Bunun sebebi, konvansiyonel sitogenetik yöntemi ile ancak çoğalmakta olan hücrelerde araştırma yapılabilmesidir. Halbuki interfaz FISH yöntemi ile tüm hücre popülasyonu değerlendirilip daha fazla sayıda genetik anomali tanımlanabilmektedir (tablo 2.1). Yine aynı çalışmada, hastaların 175'de tek klon anomalisi, 67'de iki klon, 26'da da ikiden fazla klonal anomali saptanmıştır. Tanımlanan genetik anomaliler ile sağ kalım arasında anlamlı ilgileşim bulunmuştur



Şekil 2,4. KLL'deki moleküler genetik değişikliklere bağlı sağ kalım

Hastalardan 13q delesyonu olanların, sağ kalımı, genetik anomali taşımayanlardan farksız bulunmuştur ve bu kişilerden ancak üçte biri tedaviye gereksinim duymuştur. 17p ve 11q delesyonu taşıyanlar en kötü sağ kalıma sahiptir, ayrıca bu hastalarda B semptomları, lenfadenopati ve splenomegali bulguları daha belirgindir.

Genetik anomali ile prognoz arasındaki ilginçliğin gösterilmesi dışında, bu çalışmalarda, mevcut olan anomalilerin *IgV* genindeki mutasyonlar ve hücre morfolojisindeki bozuklukları ile arasındaki ilişkilerini de tanımlanmıştır (29–31,102,103). Trizomi 12 ve 17p ile 11q delesyonları taşıyanlarda *IgV* gen mutasyonuna rastlanmaz iken, 13q delesyonu taşıyanlarda *IgV* mutasyonu yüksek oranda bildirilmiştir. Trizomi 12 sıklıkla atipik KLL ve KLL/PL’de bulunmaktadır (102), ancak tüm atipik KLL’lerde bu mutasyonun bulunmaması, hücre morfolojisindeki bozuklukların sadece genetik anomalilere bağlı olmadığı anlaşılmıştır (110–114).

Kromozomdaki değişikliklerin gen ekspresyonu üzerindeki etkileri

KLL’de en sık rastlanan yapısal anomali 13q14 delesyonudur. Bu anomaliye sahip olan vakalar genelde *IgV* bölgesinde mutasyonlar taşır, normal morfolojiye sahiptir ve iyi prognozludurlar (29,79). Bilinen anomalilerin yarısı interstisiyel delesyon içerir ve bunların neredeyse tamamında *Rb* gen kaybı gözlenir (94,98). Vakaların geri kalanında 13q bölgesini içeren translokasyonlar mevcuttur. Bildirilen translokasyonlara genellikle eş zamanlı 13q14 delesyonu da eşlik eder (100).

Rb geni, hücre çoğalmasında önemli rol oynar ve bunun kaybı sonucunda kontrolsüz hücre döngüsü ve tümör gelişimi meydana gelebilir (90,116). Bu etkilerin görülmesi için her iki alelin inaktivasyonu gereklidir, ancak p53 mutasyonunda tek alelin mutasyonu sonucunda baskın etkinlikte mutant proteinler oluşur (115,116). Konvansiyonel sitogenetik yöntemler ile 13q14 delesyonları vakaların %15-30’da gözlenir, buna rağmen FISH yöntemi ile *Rb* geninin monoalel delesyonu hastaların neredeyse yarısında saptanabilmektedir (79,104).

KLL hastaların yaklaşık %20'de 11q22-q23 delesyonu gözlenmektedir. Bu delesyon genelde genç hastalarda görülür, yaygın lenfadenopati ile ilişkilidir, hastalık hızla ilerler ve sağ kalım kısadır (79,123–125). 11q delesyonundaki kritik bölge 3-Mb segmentidir Bu bölgede NF2 tümör süpresör geni (*neurofibromatosis type 2*) ve ATM geni etkilerine sahip RDX (*radixin*) geni bulunmaktadır (124). Bu hastalarda yaygın lenfadenopatilerin gelişmesi hücrelerinde adezyon proteinlerin sayısının az olmasına bağlıdır (124,125).

Trizomi 12q13, KLL hastalarının %10-20'de görülür. Sıklıkla atipik morfoloji gösteren KLL formları ile ilişkilendirilmiştir. İlginç olarak, sadece FISH yöntemi ile saptandığı takdirde, sağ kalımı fazla etkilemezken, konvensiyonel sitogenetik ile saptanırsa sağ kalım oldukça kısadır (79.98.99). 12q13–15 mutasyonu içinde *mdm-2* geni barındırır, bu genin varlığı p53'ün mutasyonunu tetikleyebilir (122). Hastaların üçte ikisinde yüksek oranda *mdm-2* gen ekspresyonuna rastlanmasına rağmen, hastalığın seyri ile ilgili net ilişim saptanmamıştır (80).

14q32 içinde, Ig ağır zincir geni bulunur. En sık translokasyon 11 kromozomda gözlenir ancak başka kromozomlar ile de translokasyonlar bildirilmiştir (93). Nadiren de olsa bazı KLL vakalarında, mantle hücreli lenfomaya özgü olan t(11;14) (q13;q32) translokasyonuna rastlanır. Bu bölge içinde, bir G1 siklini olan siklin D1'i (*CCND1*) kodlayan *bcl-1* (*B-cell leukemia/lymphoma*) geni bulunur ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Foliküler lenfomaya özgü t(14;18) (q32;q21) translokasyonu, *bcl-2* genin fazla ekspresyonunu tetikler. KLL'de farklı olarak *bcl-2* ekspresyonun yüksek olması bu genin hipometilasyonuna bağlıdır (61,63).

2.1.6. KLL gelişiminde sitokinlerin rolü

Lenfositlerin sağ kalımında ve olgunlaşmasında büyüme faktörlerin rolü önemlidir. KLL'nin patogeneğinde, sitokinlerin üretilmesinde ve onlara karşı yanıt geliştirilmesinde çeşitli bozuklukların olduğu düşünülmektedir (127,128). Tartışmalı olmakla birlikte, bu sitokinlerin, apoptozu azalttığı ve bu nedenle KLL hücrelerin çoğalmasını uyardığı ileri sürülmüştür. Bu etkileri yanı sıra, normal lenfositlerin ve kemik iliği hücrelerin ömrünü kısaltarak, KLL'de görülen immün baskılamadan sorumludurlar.

In vitro ortamda, KLL hücreleri TNF- α ürettiği gösterilmiştir (129,130). TNF- α , bcl-2'yi etkin hale getirerek, apoptozu azaltır (129–133). Ek olarak, normal lenfositlerin çoğalmasını baskılar ve KLL hücrelerin yayılmasını kolaylaştırır. KLL hastaların çoğunda ve özellikle de ileri evre vakalarda TNF- α serum düzeyleri yüksek bulunmuştur (132).

Diğer bir sitokin olan TGF- β 'nın da KLL hücreleri tarafından salındığı bildirilmiştir (135,136). TGF- β hem normal B lenfositlerde hem de KLL hücrelerinde DNA sentezini baskılar ancak KLL hücrelerinde TGF- β reseptör sayısı çok az olması nedeniyle bunlarda bu etki sınırlıdır (137,138). Yapılan çalışmalarda, KLL hücrelerin, TGF- β aracılığı ile uyarılan apoptoza karşı devamlı bir direnç olduğu gösterilmiştir (139).

KLL hücreleri normal CD19(+) lenfositlerden farklı olarak, lenfoid kök hücre büyüme faktörü olan IL-7 üretir. Sitokin etkisi gösteren IL-7'nin hastalığın gelişmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (140). IL-7 dışında IL-2 ve IL-5 de KLL hücrelerin çoğalmasını hızlandırır (141). KLL hücreleri üzerinde bulunan TAC reseptörleri plazmadaki IL-2'yi bağlayarak normal hücreler ile etkileşime girmesini engeller (142,143). Gözlenen bu etki KLL deki immün yanıtın bozulmasını kısmen açıklar (143,144).

CD40, TNF ailesinden olan ve B hücre yüzeyinde ekspres edilen bir glikoproteindir. CD40, B hücrelerin olgunlaşmasında ve fonksiyonunda önemli rol oynar. Bu proteinin ligandı (CD40L) T hücrelerin üzerinde bulunur. CD40'ın uyarılması ile KLL hücrelerin çoğalması hızlanır ve sitokin salınımı artar (145) ayrıca kemoterapinin indüklediği apoptoza karşı direnç gelişir (146). Bu etkilerin sürekli olması için KLL hücreleri yüksek oranda CD40L salgılar (147). Diğer lenfositlerden farklı olarak KLL hücrelerin hem CD40 hem de CD40L salgılaması, malign hücre popülasyonunun kendini uyarması ile sonuçlanır (148). Diğer bir yandan, salgılanan CD40L, normal B hücrelerin otoantikor üretimini başlatabilir ve bu hastalıkta gözlenen otoimmün olayların gelişmesinde katkıda bulunabilir (128). Son olarak sağlıklı T hücrelerinde CD40L üretimini baskılayarak hem kendi hücrelerini sitotoksiteden korur hem de T hücre fonksiyon bozukluğunu meydana getirir (128,149).

Son çalışmalarda KLL hastalarında hemşire hücreleri (*nurselike cells*) tanımlanmıştır (150). Bu hücreler CD14(+) mononükleer hücrelerden köken alır. Aynı kültür ortamı içinde üretildiklerinde, hemşire hücreleri KLL hücrelerine

yapışık olarak gözlenir. Miyelomonositik hücreler ile ortak antijenler paylaşımlarına rağmen, normal monositlerden farklı olarak düşük oranda CD14,CD33 ve yüksek oranda CD68 taşırlar. Hemşire hücreleri, SDF-1 (*stromal derived factor-1*) üretirler ve KLL hücrelerin gelişiminde kakıda bulunurlar (75).

2.2. KLL’de KLİNİK BULGULAR

KLL, çoğunlukla yaşlı kişilerde görülür, ancak hastaların yaklaşık %10’u, 50 yaşatan gençtir (151,152). Hastalığın belirtileri yaşa göre farklılık göstermez. Hastaların yarısı asemptomatiktir ve başka nedenlerle yapılan kan tetkiklerinde tesadüfen lenfositözün saptanması sonucunda hekime başvurur. Daha az sıklıkla olağan muayene esnasında, lenfadenopati veya splenomegalinin araştırılması sonucunda KLL teşhisi konabilir. Asemptomatik hastaların ayrıntılı sorgulamasında, genellikle kendilerini halsiz olduklarını ifade ederler. Bazı hastalar sık bakteriyel enfeksiyonlar geçirebilir. Diğer lenfomalardan farklı olarak, ateş, gece terlemesi ve kilo kaybı özellikle erken evre hastalarda nadiren görülür.

Lenfadenopati ile gelen hastalarda sıklıkla splenomegali de eşlik eder. Servikal lenfadenopati, aksiler ve inguinal lenfadenopatiye göre daha sık görülür. Lenf nodları genellikle çok büyük değildir, kolayca hareket ettirilebilir ve hassasiyet yoktur. Ağrılı lenf nodların varlığı, üzerine eklenen viral veya bakteriyel enfeksiyonu düşündürmeli.

Erken evre hastalarda dalak büyümesi sınırlıdır ve dalak enfarktları nadir görülür. KLL’de masif splenomegali, hastalık transformasyonu (PLL) esnasında veya atipik KLL formlarında görülebilir.

Nadiren, tonsiller infiltrasyon, cilt tutulumu veya retroperitoneal konglomere lenfadenopati şeklinde bulgu verebilir.

Bunların dışında, kemik iliği infiltrasyonu veya otoimmün olaylar sonrasında gelişen periferik yıkım veya aplazi nedeniyle anemi de görülebilir.

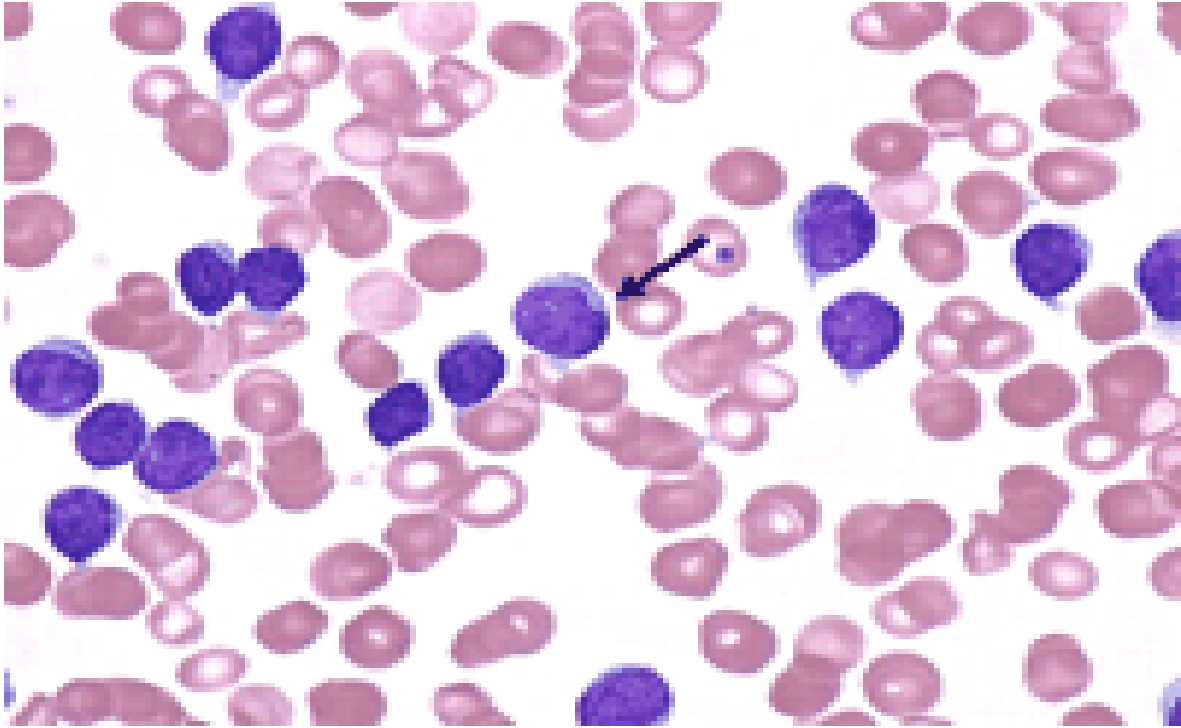
Hastaların bir kısmında, trombositopeni, kazanılmış von Willebrand faktör eksikliği veya faktör VIII eksikliğine bağlı gelişen kanamalar gözlenebilir.

İstisnai vakalarda, KLL’ye bağlı paraneoplastik sendrom gelişebilir. Bunlardan en çok bilinenler, nefrotik sendrom, pemfigus ve anjioödemdir.

2.3. LABORATUAR BULGULARI

2.3.1 Periferik kan bulguları

Eski kriterlere göre periferik kanda 10^4 /ml lenfosit sayısının KLL tanısı için yeterli idi. Son dönemdeki araştırmalara dayanarak, KLL tanısı için, periferik kanda 5×10^3 /ml, tipik immünofenotip özellikler gösteren lenfosit popülasyonunun varlığı gerekmektedir (153)



Resim 2,1. KLL'de periferik yayma bulguları. Tipik morfolojik olarak olgun lenfositlerin yanı sıra immatür prolenfositler de görülebilir

Genellikle tanı esnasında medyan lenfosit sayısı 30×10^3 /ml' dir ve bu sayı zamanla giderek artmaktadır (151,152). Hastaların yarısında lenfosit sayısının ikiye katlanması 12 aydan uzun sürmektedir. Bazı hastalarda dönemsel dalgalanmalar içinde lenfosit sayısı 50×10^3 /ml'i aşmaktadır, diğerlerinde ise bu sayı yıllarca sabit kalabilir.

Hastaların çoğunda, lenfositler olgun, küçük, kompakt kromatinli ve dar sitoplâzmalıdır (resim 2,1). Nadiren sitoplazmik inklüzyonlar da görülebilir. Periferik yaymada sıklıkla parçalanmış lenfositler gözlenir (*basket cells, smudge*

cells, smear cells) ve bunların yoğunluğu lenfosit sayısının artması ile çoğalır. Lenfositlerin bir kısmı farklı morfolojide olabilir, bazıları prolenfosit, diğerleri de geniş sitoplâzmalı plazmositoid veya çentikli çekirdekli şeklinde görülebilir. FAB sınıflamasında, hücre morfolojisine göre KLL hastaları üç gruba ayrılmıştır

Klasik KLL: Lenfositlerin %90'dan çoğu küçük olgun görünümündedir.

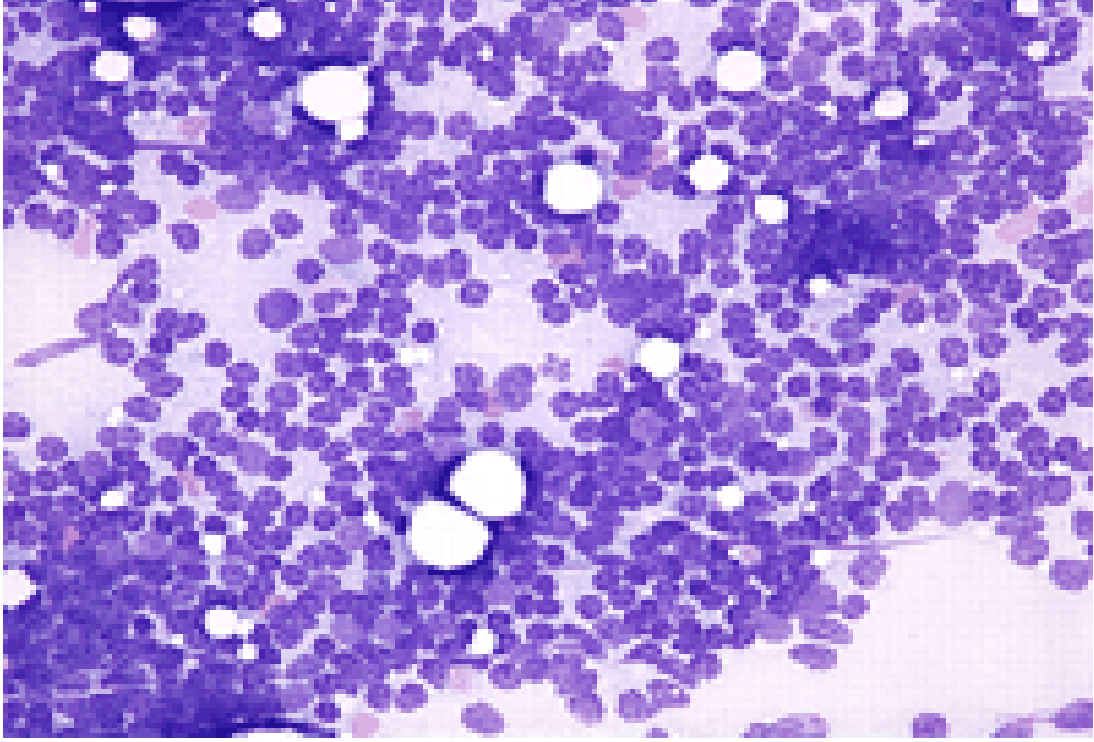
KLL/PLL: Lenfositlerin %11 - %54, prolenfositir, %55'ten fazla ise Prolenfositik lösemi olarak tanımlanır.

Atipik KLL: Lenfositlerin %15'ten çoğu plazmositoid veya çentiklidir, prolenfosit oranı %10'dan azdır (101.102.156).

Hastaların %80'i klasik KLL morfolojik özelliklerini taşıırken geri kalan %20'i KLL/PLL veya atipik KLL'dir.

2.3.2. Kemik iliği ve lenf nodu bulguları

KLL' de kemik iliği tutulumunun dört şekli bilinmektedir (157). İliğin infiltrasyonu, diffüz, interstisiyel, nodüler veya karışık (nodüler ve interstisiyel) olabilir. Bunlardan en sık karışık tutulum gözlenirken en az nodüler tutuluma rastlanmaktadır (resim 2,2). Diffüz tutulumda, yağ hücreleri tamamen silinmiştir ve prognoz en kötüdür (157). Kemik iliği tutulumun aksine lenf nodu tutulumu genelde diffüzdür. Hem lenf nodunda hem de kemik iliğinde, prolenfosit ve paraimmünoblastlardan oluşan proliferasyon merkezlerine sıklıkla rastlanmaktadır (107).



Resim 2,2. KLL’de kemik iliği tutulumu. En sık diffüz tipte tutulum gözlenmektedir

2.3.3. İmmünofenotipleme bulguları

Genel kaniya göre, KLL, tek B lenfositin habis dönüşümü ve ardından da klonal çoğalması sonucunda geliştiği düşünülür. Vakaların çok küçük bir kısmı (<%1), T lenfositlerden köken alır (158). Ancak bu vakalar ayrıntılı bir şekilde incelendiğinde, T hücreli prolenfositik lösemnin bir türü oldukları anlaşılır (159). Elektron mikroskopisi ile incelendiklerinde, bu hücrelerin nükleoller içerdiği gözlenir. Aynı T hücreli prolenfositik lösemi hücreleri gibi, 14 ve 8 kromozom anomalileri içerirler ve kuvvetli bir şekilde CD7 eksprese ederler (158,159). Bunun dışında, bunlar sıklıkla cildi tutar, kötü seyirlidir ve kemoterapilere sıklıkla direnç gösterirler (159).

Klasik B hücreli KLL’ de, lenfositlerin kendilerine has birçok belirteçleri vardır. Bu belirteçler sayesinde diğer hastalıklardan kolayca ayrılabilirler.

Lösemik hücreler CD5(+)’tir, diğer B hücre belirteçlerinden CD19, CD20(zayıf), CD43 ve CD79b(zayıf) eksprese ederler. Bunların dışında hücreler genelde klonal hafif zincir kısıtlamalıdır, sIgM ve sIgD’yi zayıf eksprese eder , CD23(+) ve CD10(-) tir. KLL hücrelerin bellek B lenfositlerden köken aldığıının bir ispatı olarak aynı zamanda CD27(+) de eksprese ederler. CD27’ nin CD23 ve CD5 ile birlikte eksprese olması hücrelerin aktive olduğunu gösterir (164).

Yukarıdaki bilgilere dayanarak, KLL’ in diğer B lenfoproliferatif hastalıklardan ayırımı için, Matutes ve arkadaşları beş belirtecin kullanılmasını önermiştir (162,165). Tipik olarak KLL hücreleri yüzey Ig zayıf eksprese eder, CD5(+), CD23(+), CD79b/CD22(+/-) ve FMC7(-)’ tir (tablo 2.2).

KLL hücrelerin olgunlaşma düzeylerin saptanması için, Damle ve arkadaşları, hücre yüzeyindeki CD38 seviyelerini araştırmıştır (30). Araştırılan hastaların yaklaşık yarısında, CD38 seviyeleri %30’dan yüksek bulunmuştur. Bu hastaların takibinde, sağ kalımların daha kısa olduğu saptanmıştır. CD38 hücre olgunlaşmasında önemli rol oynar. Yüzey IgM tarafından CD38 aktivasyonu apoptozu inhibe eder, IgD ile aktive edildiğinde de hücre olgunlaşmasını hızlandırır ve hücrenin ömrü uzar (166).

KLL’nin diğer özelliklerinden biri de CD23’ün fazla eksprese edilmesidir. CD23 aktivasyon belirteci olup, apoptozun baskılanmasında rol oynar (167). Diğer yandan CD23, KLL’nin, diğer CD5(+) olan hastalıklardan (Mantle hücreli lenfoma) ayırımı için önemlidir.

Yapılan son araştırmalarda, CD23 seviyelerin yüksek olması, Notch2 ileti yollarında meydana gelen denetim bozukluğundan kaynaklandığı anlaşılmıştır (168). Hücre yüzeyindeki CD23 kendiliğinden proteolize uğrar ve serumda serbest halde dolaşır. Ölçülen serum CD23 düzeyleri, hastalığın ilerlemesi ile giderek artar.

B hücre antijen reseptör kompleksi, B lenfositlerin immün uyarımlar sonucu çoğalmasında en önemli reseptördür. Bu kompleks sIg ve $Ig\alpha/Ig\beta$ ‘ dan oluşmaktadır (CD79a/CD79b). KLL hücrelerinde farklı olarak CD79b bulunmamaktadır. Bunun sebebi, genin alternatif olarak bölünmesi sonucunda meydana gelen CD79a’nın aşırı ekspresyonudur (169). Normal erişkinlerin %3,5’de az sayıda CD19⁺/CD5⁺ ve CD79b⁻ B lenfositleri bulunabilir. Bu kişilerde KLL gelişme riskinin ne olduğu bilinmemektedir, ancak bu hücre popülasyonu monoklonal

olmasına karşın, genelde CD38(-)'tir ve *IgV* mutasyonu taşır, bu sebeple iyi prognoz grubuna dahil edilebilir (170).

FMC7 genellikle, saçlı hücreli lösemide ve prolenfositik lösemide yaygın olarak eksprese edilir. KLL hastaların yaklaşık %16'da FMC7 pozitif bulunabilir (160). Sıklıkla FMC7(+) olan hastalarda yüzey IgM ekspresyonu belirgin olup, CD23(-)'tir ve prognoz oldukça kötüdür.

Miyelomonositik antijenlerden CD11b ve CD13, KLL hastaların küçük bir kısmında saptanabilir. Bunların varlığı, yaygın kemik iliği tutulumu ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (172).

CD5 antijeni en sık olgun T lenfositleri ile bağlantılıdır, ayrıca timositlerde de zayıf olarak eksprese edilir (3,173). Bunu dışında, lenf nodların mantle bölgesinde bulunan normal B lenfositleri de CD5 taşıyabilir ve bazen de periferik kanda da bu hücreler rastlanabilir (173). Normal T lenfositlerinde CD5 antijeni hücre aktivasyonunda rol oynar. B lenfositlerdeki CD5'in görevi tam olarak bilinmemekle beraber, T hücrelerden salınan İL-4 tarafından baskılandığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda CD5(+) B lenfositlerin *in vitro* uyarılması sonucunda, anti DNA antikoru ve romatoid faktör sekrete ettikleri gösterilmiştir. Romatoid artrit, SLE ve Sjögren hastaların periferik kanlarında artmış sayıda CD5(+) B lenfosit olduğu bildirilmiştir (4). Bu bulgulara dayanarak otoimmün hastalıklarda görülen CD5(+) B lenfositlerin, KLL'de olan hücrelerin "normal" formu olduğu düşünülmüştür (3,4). Yapılan ayrıntılı immünofenotip araştırmaların sonucunda, bunların iki ayrı hücre grubu olduğu belirlenmiştir (3.4.164).

KLL hastaların yaklaşık %5'de CD5(-) olarak bulunmaktadır, bu vakalar genelde FMC7(+), CD23(-), CD11b(+) ve CD13(+)'tir ve prognozları daha kötüdür (160,162). Son dönemde, CD5(-) olan hastaların KLL olmadığı ileri sürülmüştür, buna dayanarak NCI-WG, CD5(+)'i, KLL'de mutlak olması gereken tanı kriteri olarak belirlemiştir.

KLL hücrelerin yüzeyinde CD belirteçlerin dışında, monoklonal özellikler gösteren immünglobulin zincirleri bulunmaktadır. Bunların içinde en sık κ ve λ hafif zincirlerine rastlanmaktadır (1.2.3). Hastaların küçük bir kısmında, KLL'ye özgü *Ig* gen yapılandırma kusurlarından köken alan monoklonal polireaktif IgM tipinde otoantikorlar bulunmaktadır (3.4.173). Bu otoantikorlar, romatoid faktör grubundan olup, sıklıkla IgG, histonlar, kardiolipinler, çift sarmal DNA gibi antijenler ile etkileşime girerler (173).

Geleneksel olarak KLL hücrelerin belirli bir olgunlaşma evresinde sabit kaldıkları düşünülür, ancak son yapılan çalışmalarda IgM(+) hücrelerin bir kısmı IgA ve nadiren de IgG tipine dönüşebildikleri gösterilmiştir (176,177).

KLL hastaların yarısından çoğunda *in vitro* ortamda, monoklonal antikor üretilebilmiştir, ancak hastalığın seyri esnasında sadece %5’de protein elektroforezinde saptanabilecek düzeyde monoklonal protein bulunmaktadır (166).

Yüzey belirteçi	Puan
Yüzey Ig	Zayıf: 1 Kuvvetli: 0
CD5	Pozitif: 1 Negatif: 0
CD22/CD79b	Zayıf: 1 Kuvvetli: 0
CD23	Pozitif: 1 Negatif: 0
FMC7	Negatif: 1 Pozitif: 0

Tablo 2,2 Kronik Lenfositik Lösemi tanısında yüzey belirteçlerine dayalı skorlama sistemi. KLL tanısı için 4 veya 5 puan olması gerekmektedir. Matutes E. ve Pollack A. dan uyarlanmıştır.

2.4. KLL’DE TANI

KLL çalışma gruplarından, *International CLL Workshop* ve *NCI-WG*, KLL tanı kriterlerini aşağıdaki şekilde belirlemişlerdir.

- 1. Periferik kan lenfosit sayısının sürekli olarak 5×10^3 /ml ‘den yüksek olması ve lenfosit popülasyonun büyük çoğunluğu olgun lenfositlerden oluşması. Lenfositler, %55’den daha düşük oranda atipik morfolojide bulunması gerekir ve aşağıdaki özellikleri taşımalıdır:**
 - a) B hücreye özgü yüzey belirteçleri taşınmalı (CD19,CD22 ve CD23) ve CD5(+) olmalı. Diğer T hücre belirteçlerini bulundurmamalı.**
 - b) Monoklonaliteyi destekleyen yüzey κ veya λ Ig hafif zinciri taşınmalı.**
 - c) Düşük yoğunlukta yüzey Ig taşınmalı**
- 2. Kemik iliği aspiratında lenfosit oranı %30’dan yüksek olmalı.**

2.5. KLL'de TANISAL ARAŞTIRMALAR VE EVRELEME

2.5.1. Tanısal araştırmalar

KLL'de tanıyı koymak ve prognozu belirlemek için ilk aşamada, tam kan sayımı, periferik yayma ve immünofenotipleme analizi yapmak gerekir. Tanı koymak için kemik iliği biopsisi yapmak zorunlu değildir, ancak KLL'nin kemik iliğinde ne şekilde yayıldığı prognostik açıdan önemli olduğundan, bir engel yok ise yapılması önerilir.

Bunun dışında retikülosit sayısı, Coombs testi, karaciğer fonksiyon testleri ve serum immün elektroforezi tetkikleri yapılmalı. Eğer monoklonal protein saptanırsa, İFE ile idrar ve serumdaki oranları kaydedilmeli ve tedavi boyunca takipedilmeli. Beta 2 mikroglobulin düzeyleri prognoz açısından önemli olması nedeniyle yakından takip edilmeli (178). Diğer önemli prognoz belirteçi olan sitogenetik bozukluklar tercihen FISH yöntemi ile araştırılmalı.

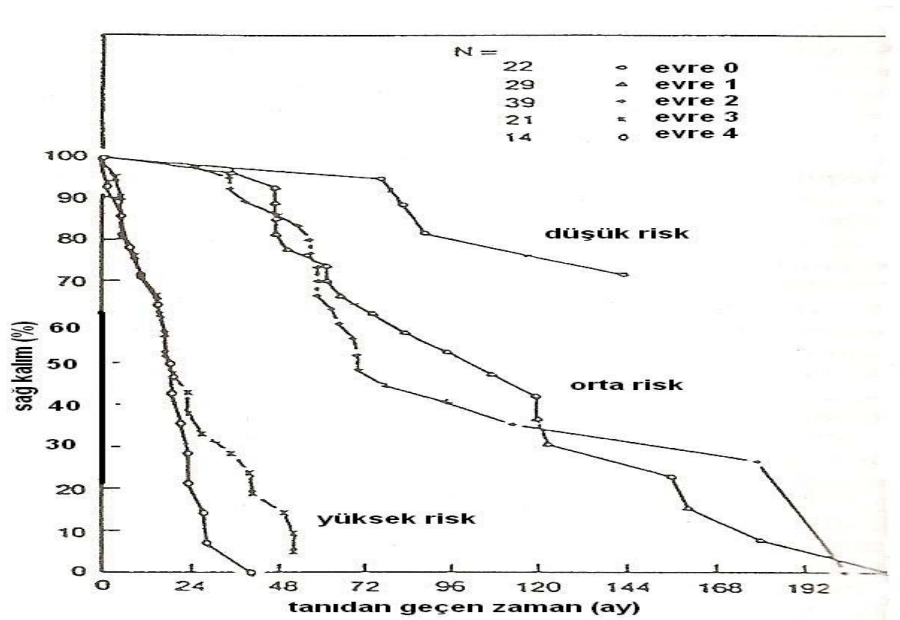
2.5.2. KLL'de Evreleme

KLL'de kullanılan evreleme sistemleri, hastalığın ciddiyeti ve prognozu hakkında önemli bilgiler sunarlar (179, 180). Rai evreleme sistemi genellikle Kuzey Amerikada kullanılmaktadır. Evreleme sistemi, lenfadenopati, splenomegali, anemi ve trombositopeni bulgularına göre hastaları beş ayrı gruba ayırmaktadır (179)

(tablo 2,3). Buna göre hastalar üç farklı prognostik gruba ayrılır, böylece takip ve tedavi hakkında daha kolay karar verilebilir (şek 2,5)

Rai sınıflandırması		
Evre	Tanımlama	Risk durumu
0	Lenfositoz, kandaki lenfositlerin >15000/mcL ve > %40 kemik iliğinde	İyi Sağ kalım >10 yıl
i	Evre 0 ve LAP	Orta Sağ kalım 9 yıl
ii	Evre 0-I ve SM, HM veya her ikisi	Orta Sağ kalım 7 yıl
iii	Evre 0-II ve Hgb<11gr/dl veya Hct<%33	Yüksek Sağ kalım 5 yıl
iv	Evre 0-III ve trombosit sayısı<100000/mcL	Yüksek Sağ kalım < 5 yıl

Tablo 2,3. Kronik Lenfositik Lösemide Rai sınıflandırması



Şekil 2,5 Rai evreleme sistemine göre Kronik Lenfositik Lösemi hastaların sağ kalımı.

Binet evreleme sistemi en sık Avrupa ülkelerinde kullanılmaktadır. Bu evreleme sistemi, tutulmuş olan bölge sayısı, hemogloblin düzeyi ve trombosit sayısına göre düzenlenmiştir. Hastalık tarafından tutulmuş bölgeler, üç lenf nodu bölgesi (servikal, aksiler ve inguinal lenf nodları), dalak ve karaciğer olarak belirlenmiştir (tablo 2,4).

<i>Binet sınıflandırması</i>	
<i>Evre</i>	<i>Tanımlama</i>
<i>A</i>	<i>Hgb > 10gr/dl ve Plt>100000/mm³ ve <3 alanda LAP Sağ kalım >10 yıl</i>
<i>B</i>	<i>Hgb >10gr/dl ve Plt>100000mm³ ve > 3 alanda LAP Sağ kalım 7 yıl</i>
<i>C</i>	<i>Hgb< 10gr/dl ve/veya Plt <100000mm³ ve herhangi bir LAP veya HSM Sağ kalım <5 yıl</i>

Tablo 2,4 Kronik Lenfositik Lösemide Binet sınıflandırması.

2.6. KLL'DE PROGNOSTİK FAKTÖRLER

KLL hastaların sağ kalımı genellikle iyi olmakla birlikte oldukça değişken olabilir. Bazı hastaların sağ kalımı oldukça uzundur hatta kendiliğinden remisyona girebilirler (181). Ancak bazılarında hastalık seyri çok hızlıdır ve kısa sürede ölümlerle sonuçlanır. Günümüzde yaygın kullanılan Rai ve Binet sınıflandırma sistemleri basit ve güvenilir prognostik ölçütlerdir (253¹⁷⁹,254¹⁸⁰). Yine de, herhangi bir risk grubu içinde bulunan hastalar arasında da belirgin prognoz farklılığı gözlenebilir, bu yüzden evrelemenin dışında başka prognostik belirteçlerin kullanılması kaçınılmazdır (tablo 2,5).

Yaygın kullanılan tetkikler ve yöntemler
İleri evre (Rai veya Binet) Atipik morfoloji veya KLL/PLL Periferik kanda lenfosit sayısının ikiye katlanma süresi < 12 ay olması İmmünofenotipleme: yoğun yüzey IgM, FMC7(+), CD23(-), CD11b(+), CD13(+), CD38(+) Yüksek β 2-mikroglobulin düzeyi Diffüz tipte kemik iliği tutulumu Yüksek LDH düzeyi Kemoterapiye kötü yanıt
İleri araştırma tetkikleri
<i>IgV</i> mutasyonunun olmaması ZAP-70 proteinin yüksek ekspresyon düzeyi FISH ile yapılan araştırmalarda del 11q, del 17p, trizomi 12 saptanması Artmış serum CD23 düzeyleri, yüksek TNF- α ve timidin kinaz düzeyleri

Tablo 2,5. Kronik Lenfositik Lösemide kötü prognoz belirteçleri

Risk gruplarının belirlenmesi için birçok yeni yöntemler ile çalışmalar sürdürülmektedir. Yeni kullanılan prognostik belirteçlerin bir kısmı yakın zamanda KLL tanı ve tedavi seçiminde önemli rol oynayacaklardır.

2.6.1. Rai ve Binet evreleme sistemleri

Rai evrelemesine göre düşük risk grubunda yer alan ve sadece lenfositozu olan hastaların (%31) sağ kalımı 10 yıldan fazladır ve normal toplumdaki farkıdır, bu nedenle tedavi gerekmemektedir. Orta risk grubunda (%61) yer alan, lenfadenopati ve/veya splenomegalisi olan hastaların ortanca sağ kalım süresi 7 ile 9 yıl arasındadır. Bu hastalar belirgin olarak daha fazla tümör yükü taşırlar ve tümör kitlesine bağlı hastalık belirtileri gelişebilir. Yüksek risk grubunda (%8) yer alan hastaların genelde anemisi ve/veya trombositopenisi vardır, hastalık hızlı seyrederek ve ortanca sağ kalım süreleri 5 yıldan azdır.

Binet A evresinde bulunan hastaların (%63) ortalama yaşam süresi 10 yıldan fazladır, evre B olanların (%30) 7 yıldır ve evre C olanların (%7) sağ kalımı 5 yıldır (182, 183). Kullanılan iki evreleme sistemi oldukça faydalı bilgiler sunmasına rağmen birbirileri ile tam ilişki göstermezler. Buna göre Binet A evresinde Rai düşük risk grubuna göre

iki kat daha fazla hasta yer almaktadır, tam tersi de Binet B evresi ve Rai orta risk grubunda olan hastalar için geçerlidir.

Binet A evresi ve Rai düşük risk grubunda olan hastaların ortanca yaşam süreleri 10 yıl olmasına rağmen, bu hastalardan %40 ileri evrelere geçecektir ve %50'i herhangi bir zamanda tedavi almak zorunda kalacaklardır. Hastaların %25'i de KLL nedeniyle yaşamlarını kaybedeceklerdir (182,173).

2.6.2. Yaş ve cinsiyet

KLL hastaların yaklaşık %10, 50 yaşından gençtir, bu hastalar ileri yaş grubundakiler ile benzer klinik özellikler gösterir (151,152). Her iki yaş grubunda da sağ kalım benzerdir, ancak KLL' ye bağlı ölüm riski genç yaş grubunda daha fazladır (152). Genç yaş grubunda olan hastaların bir kısmında KLL oldukça kötü seyretmektedir ve bu kişilerde Richter transformasyonu riski beş kat daha fazladır.

KLL' de erkek kadın oranı 2:1 dir. Kadınlar genellikle erken evre hastalık özellikleri gösterir. Yaş ve evreye bakmaksızın, kadınlarda prognoz genellikle daha iyi olduğu bildirilmiştir (184).

2.6.3. Lenfosit özellikleri

Morfoloji: Hastaların yaklaşık %20'i atipik KLL veya KLL/PLL özellikleri taşır. Bu hastalar genelde ileri evrededir, yüksek proliferatif indeksleri vardır ve prognozları kötüdür (101.102.113.162). Bunun dışında, atipik morfolojik özellikler taşıyan hastalarda, trizomi 12, del 17p, CD38(+) ve *IgV* mutasyon eksikliğine daha sık rastlanmaktadır.

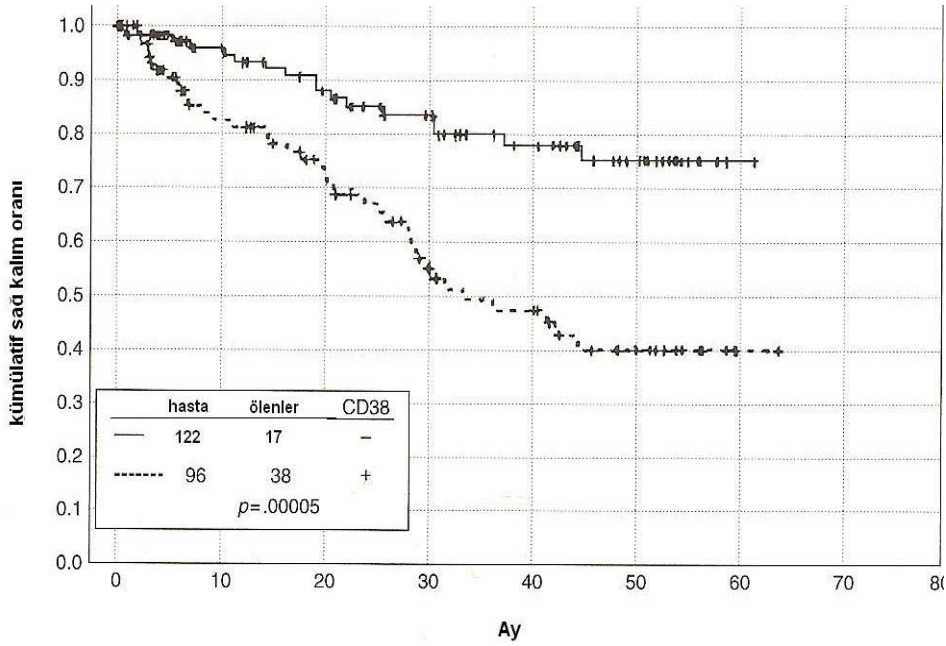
Lenfosit sayısı: Lenfosit sayısının artması ile sağ kalım azalmaktadır (185). Lenfosit sayısı $20 \times 10^3/\text{ml}$ ' den az ise ortalama sağ kalım 8,6 yıl iken, lenfosit sayısı $40 \times 10^3/\text{ml}$ ' den fazla olduğunda beklenen sağ kalım süresi 3,7 yıldır.

Lenfosit sayısının ikiye katlanma süresi (doubling time): İkiye katlanma süresi hastalığın agresif seyri için yararlı bir ölçüttür. İndolent KLL hastalarında ikiye katlanma süresi oldukça uzundur, ancak bu sürenin 12 aydan kısa olduğu vakalarda belirgin olarak sağ kalım kısalmaktadır (186, 187).

2.6.4. İmmün belirteçler:

İmmünofenotipleme özelliklerindeki bazı değişiklikler örn. yüzey Ig yoğunluğunun yüksek olması, FMC7(+), CD23(-) olarak saptanması, KLL de atipik morfoloji, trizomi 12 varlığı ve kötü prognoz ile ilişkili olabilir (101.160.161, 188).

Birçok çalışmada, CD38'in önemli bir prognostik belirteç olduğu saptanmıştır (264¹⁸⁹,266¹⁹¹) (şekil 1,7)



Şekil 2,6 CD38 durumuna göre sağ kalım eğrileri. %20' den daha yüksek oranda CD38(+) olan hastaların sağ kalımı anlamlı olarak daha kısadır.

Tüm bu çalışmalarda, CD38' in yüksek ekspresyonu, kısa sağ kalım, ileri Rai evresi, toraks ve batin içi lenfadenopati, kısa ikiye katlanma zamanı, artmış $\beta 2$ -mikroglobulin düzeyi ve atipik morfoloji ile ilişkili bulunmuştur (264,265¹⁹⁰). Hastaların takibi esnasında, CD38(-) olanlar zamanla CD38(+) hale gelebilir. Bu durum, p53 mutasyonun *de novo* gelişmesi ve hastalığın progresyonu ile ilişkilidir (266).

İleri evre hastaların bir kısmında CD4/CD8 oranı düşüktür ve NK hücrelerin sayısı azalmıştır, bunun sonucunda hipogamaglobulinemi gelişir ve sağ kalım belirgin olarak kısalmıştır (267¹⁹²,268¹⁹³).

2.6.5. Moleküler genetik ve sitogenetik özellikler:

Daha önce de bahsedildiği gibi, sitogenetik çalışmalar sonucunda, hastalığın prognozu hakkında çok önemli bilgiler elde edilebilmektedir. KLL hücrelerinde metafaz elde etmek güç olduğundan, interfaz FISH yönteminin kullanılması öncelik kazanmıştır.

Özellikle 17p13 veya 11q22-11q23 mutasyonu taşıyanların prognozu çok kötüdür. Trizomi 12, atipik morfoloji, farklı immünofenotipik özellikler, ileri hastalık ve kötü prognoz ile ilişkilidir. 13q mutasyonu tek başına, *IgV* gen rearanjmanı ve iyi prognoz ile ilişkilidir.

Günlük tıp pratiğinde kullanılmamasına karşın, akademik araştırmalarda bakılan ATM, *Rb* ve P27^{KIP1} gen mutasyonlarının varlığı KLL hastalığının seyrini olumsuz etkiledikleri saptanmıştır.

CD49d ve ZAP-70' in prognostik önemi

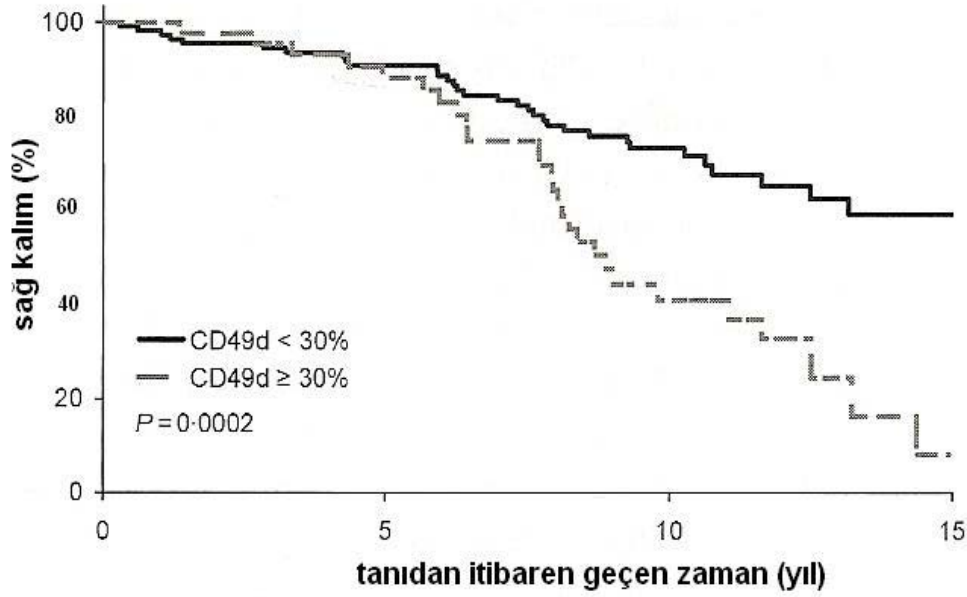
CD49d (integrin α), lökositlerin dolaşımında, aktivasyonunda ve sağ kalımında önemli rol oynar. Bunun dışında, VCAM-1 ve fibronektin aracılığı ile, germinal foliküllerde bulunan lenfositler ile stromal hücreler arasındaki etkileşimin sağlanmasında görev alır (194). Adezyon görevleri yanı sıra, CD49d, iletişim reseptörü olarak ta görev alır. Böylece *bcl-2* ailesine ait proteinleri etkin hale getirerek, B hücre sağ kalımına katkıda bulunur (194).

Yapılan araştırmalarda, KLL hücrelerinde CD49d ekspresyonu, normal B lenfositlere göre daha düşük düzeyde olduğu saptanmıştır (195,196). Bu özelliği ile KLL hücreleri, diğer düşük evreli lenf kanserlerinden, ayrılmaktadır (197,198). Buna rağmen KLL hastaların bir kısmında CD49d belirgin olarak eksprese edilmektedir. Bu hastaların genellikle yaygın lenfadenopatileri vardır ve ileri evre hastalardır (199,200).

Yapılan *in vitro* çalışmalarda, CD49d üzerinden sağlanan hücre içi iletişim sonucunda, ilaca bağlı ve kendiliğinden oluşan apoptozda baskılanma olduğu gösterilmiştir (201).

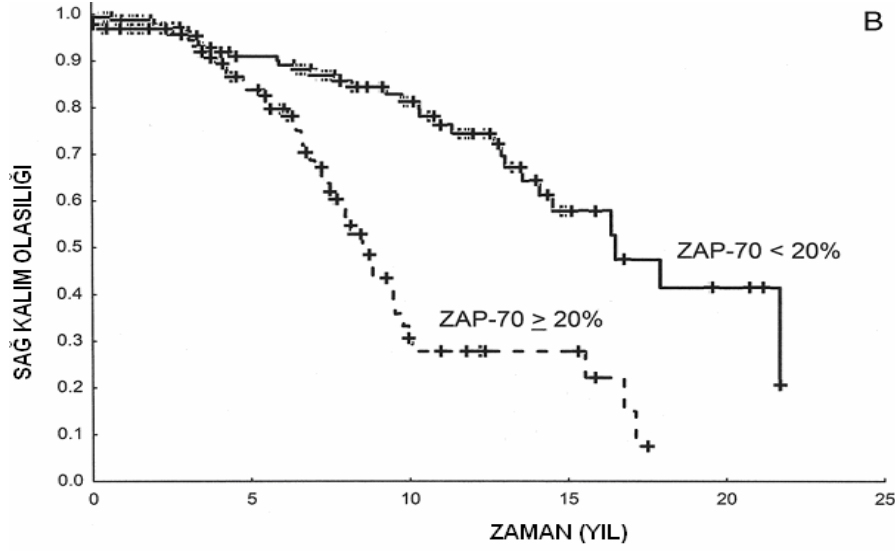
CD49d' nin KLL prognozu üzerindeki etkisi hakkında çok az çalışma yapılmıştır. Durig ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma sonucunda CD49d gen ekspresyonunun (ITGA4), CD38 gen ekspresyonu ile birlikte olduğu gösterilmiştir (202). Diğer yandan Zucchetto ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada, CD49d ekspresyonunun, CD38' den

bağımsız olarak KLL hastalarında, sağ kalımı etkileyebileceği ileri sürülmüştür (203) (şekil 2,7)



Şekil 2,7 CD49d ekspresyon oranına göre toplam sağ kalım eğrileri.

ZAP-70 proteini, T hücrelerinde, sinyal iletimi ile ilgili bir protein kinazdır. Hücre yüzeyinde immünofenotipleme ve Western blot teknikleri ile gösterilebilir. Yapılan çalışmalarda KLL hücrelerinde de bulunabileceği gösterilmiştir. Bu proteinin varlığı prognoz açısından çok önemlidir. Genellikle *IgV(-)* hastalarda bulunur ve CD38' e oranla *Ig* gen mutasyonu hakkında daha anlamlı bir ilişki içindedir. Buna dayanarak ZAP-70(+) hastaların prognozunun daha kötü olduğu ve bu hastaların daha erken dönemde tedaviye gereksinim duyduğu anlaşılmıştır (şekil 2.8)



Şekil 2.8 ZAP-70 ekspresyon oranına göre toplam sağ kalım eğrileri.

2.6.6. Kemik iliğin histolojik özellikleri

Kemik iliğinde nodüler ve interstisyel yayılım benzer tümör yükü taşımaktadır. Nodüler yayılım olan hastaların sağ kalımı 90 ay, interstisyel yayılım olan hastaların sağ kalımı ise 46 aydır. Diffüz yayılım özellikleri taşıyan hastaların prognozu kötüdür ve ortalama sağ kalımları 28 aydır (157). Yapılan son çalışmalarda kemik iliğin tutulum şeklinin hastalığın evrelemesine de katkıda bulunabileceği anlaşılmıştır (204). Kemik iliğinde fibrozisin saptanması, hızlı hastalık seyri ile ilişkili bulunmuştur (205).

Kemoterapi sonrası kemik iliğinde hala lenfoid nodüllerin bulunması (nodüler parsiyel remisyon), kısa sürede relaps gelişeceğinin işaretidir (206, 207).

2.6.7. Serum belirteçleri

Serum belirteçlerinden, LDH, β 2-mikroglobulin, CD23, IFN- α ve timidin kinaz, agresif seyirli KLL hastalarında, yüksek düzeylerde saptanmaktadır (208–210). Bunlardan LDH, β 2-mikroglobulin ve CD23 muhtemelen tümör yükünü yansıtmaktadır ve takipte kullanılmaları önemlidir. Timidin kinaz, DNA sentezinde kurtarma yolağında (*salvage pathway*) yer alır ve bölünmekte olan hücrelerin sayısını yansıtır.

3. ÇALIŞMANIN ARAÇ VE YÖNTEMLERİ

3.1. Çalışmanın Yöntemi

Çalışma, Marmara Üniversitesi Hastanesi, Hematoloji Bilim Dalı tarafından yürütülmüştür. Araştırma Hematoloji polikliniğine kayıtlı tüm KLL hastaların tıbbi kayıtları üzerinden yapılmıştır.

Toplam 118 hastadan, 74'ünde uygun kayıtlara ulaşılmıştır ve bu hastalar çalışmaya dâhil edilmiştir. Araştırma için Fakültemiz Etik Kurul tarafından gerekli izin alınmış olup, hayatta olan ve takibe devam eden hastalardan, kendileri tarafından imzalanmış olan, bilgilendirilmiş onay formu alınmıştır (**Çalışmanın Etik Kurul protokol No: MAR-YÇ–2009–0022**).

Araştırma, geriye dönük olarak, hastalık ile ilgili geçmiş verilerin toplanmasına dayanan bir multiparametrik sağkalım çalışmasıdır.

Çalışmanın esas amacı KLL'de önemli prognostik belirteçlerin sağ kalım ve hastalığın seyri üzerindeki etkilerini belirlemektir. Bu amaca yönelik, hasta dosyalarından, hastalığın tanı tarihi, tanı esnasındaki evreleri (Rai), tanı esnasındaki mutlak lenfosit sayıları ile ilgili kayıtlar toplanmıştır. Aynı dönemde immünofenotipleme yöntemi ile belirlenmiş CD5+19, CD23+43 koekspresyonu, CD49d, ZAP-70, CD38, Kapa ve Lambda ekspresyon oranları da, prognostik ölçütler olarak çalışmaya alınmıştır. İlk tedaviye kadar geçen zaman, uygulanan tedavi şekli, tedavi sonrası remisyon süreleri ve tanıdan itibaren toplam sağ kalımları ile ilgili veriler her hasta için kaydedilmiştir.

Çalışmaya alınan KLL hastalarında kullanılan tanı kriterleri: Periferik kandaki mutlak lenfosit sayısının $5000/\text{mm}^3$ üstünde olması. Lenfosit popülasyonun, CD5(+), CD10(-), CD19(+), CD22(+), CD23(+) hücrelerden oluşması, Kapa veya Lambda yüzey immunoglobulini taşıması ve bu belirteçler ile monoklonal özellikler göstermesi. Bunun yanı sıra, kemik iliğinde %30'dan fazla, aynı immunohistokimyasal özellikler taşıyan monoklonal olgun lenfosit popülasyonun bulunması ile KLL tanısı konmuştur.

Bu çalışmanın bulgularına dayanarak, tedaviye ve takibe devam eden hastalara, ek olarak herhangi bir tıbbi müdahale yapılmamıştır. Hastalardan, ayrıca herhangi bir tetkik istenmemiştir.

Araştırmaya dâhil edilen 74 hastanın dosyalarında kayıtlı olan bilgiler toplandıktan sonra istatistiksel yöntemler ile tek değişkenli ve çok değişkenli dağılım ve sağ kalım analizleri yapılmıştır

3.2. Çalışmada kullanılan Araçlar

Çalışma tamamen bilgisayar ortamında yapılmış olup sadece istatistiksel analiz için gerekli olan lisanslı yazılımlar kullanılmıştır.

Hastaların kayıtlarında bulunan hematolojik ve immünolojik tahlillerin hepsi hastanemizin merkez Biyokimya laboratuvarı ve İmmünoloji laboratuvarı tarafından yapılmıştır.

Araştırmada prognostik kriter olarak ele alınan mutlak lenfosit sayısı Coulter cihazı ile bakılan hemogram sonuçlarından hesaplanmıştır.

İmmünolojik belirteçlerden, CD5+19, CD23+43, Kapa, Lambda CD49d, ZAP-70 ve CD38, standart direkt immünfluoresan işaretleme yöntemi ile işaretlendi ve FACS CANTO (Becton Dickinson, Mountain View, California, ABD) cihazı ile okundu ve değerlendirildi.

CD49d'nin hesaplanması: Akım sitometri ile CD49d'nin CD11a(+) hücrelerdeki (tüm lenfositler) ekspresyon oranı bulunduktan sonra, CD5+19 eksprese eden hücrelerin (KLL hücreleri) oranına göre yeniden hesaplanmıştır ve sadece KLL hücrelerindeki ekspresyon oranı bulunmuştur. Çalışmada, reel CD49d oranı olarak belirtilmiştir.

ZAP-70'in hesaplanması: Akım sitometri yöntemi ile ZAP-70'in, CD20(+) hücreler içindeki ekspresyon oranı hesaplanmıştır.

CD38'in hesaplanması: Akım sitometri yöntemi ile CD38'in, CD22(+) hücreler içindeki ekspresyon oranı hesaplanmıştır.

3.3. İstatistiksel analizler

Verilerin dağılım normallikleri, Shapiro Wilks testinin bir benzeri olan Ryan Joiner testi ve binomial test ile değerlendirilmiştir. Veriler ortalama, ortanca, ortalamanın standart hatası, standart sapma, alt ve üst değer aralıkları ve %95 güvenlik aralığı ile tanımlanmıştır. P değeri çift yönlü olarak değerlendirildikten sonra 0.05 ve altındaki değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Parametrik verilerin karşılaştırılmasında; bağımsız örneklerde t testi, normal dağılım göstermeyen parametrik ve parametrik olmayan verilerin karşılaştırmasında; Mann Whitney, kıkare, Yate düzeltmeli kıkare, Fisher kesinlik testi ve Kolmogorov Smirnov testleri, korelasyon analizinde; normal dağılım göstermeyen parametrik ve parametrik olmayan veriler için Spearman iki değişkenli korelasyon analizi, tedaviye kadar geçen zaman (TKGZ) ve sağkalım (TS) hesaplamalarında; Kaplan Meier, verilerin sağkalım ve TKGZ ile ilişkilerinin tek değişkenli analizinde; log-rank (Mantel-Cox) testi, tek değişkenli analizde istatistiki anlamlılığa ulaşan verilerin çok değişkenli analizinde; Cox orantısal risk regresyon modeli kullanılmıştır. Verilerin analizi SPSS® 15.0 for Windows (SPSS inc., Chicago, IL, A.B.D) ve Minitab® 15.1.0.0 (Minitab Inc., State College, PA, A.B.D) ve MedCalc® 10.1.3.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belçika) yazılımları ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

Hastanemizde Hematoloji bölümü 1987 yılından beri hizmet vermektedir, ancak bu dönemde bazı immünolojik belirteçlerin bakılmamış olması (CD49d, ZAP-70) ve araştırmamıza uygun olan hasta bilgileri ancak 1998 yılından itibaren kaydedilmeye başlanmış olması nedeniyle sadece bu dönemden sonra kayıtlı olan hastalar araştırmaya dâhil edilmemiştir.

1998 ile 2008 yılları arasında polikliniğimizde takip edilen KLL hastalarından 118'nin dosya kayıtlarına ulaşılabilmiştir. Bu hastalardan 74'ünde çalışmamıza dâhil edilebilecek nitelikte tıbbi kayıtlar elde edilmiştir. Çalışmaya, hayatta ve ölmüş olan tüm KLL hastalarının tıbbi kayıtları alınmıştır. Hastaların klinik ve demografik özellikleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (tablo 4,1)

Değişken	Kadın	Erkek	Tüm hastalar
Hasta sayısı	25 (%35)	49 (%65)	74 (%100)
Yaş ortalaması	62,9	63,1	63,1
Düşük risk	12	18	30 (%40,5)
Orta risk	5	20	25 (%33,7)
Yüksek risk	8	11	19 (%25,8)
Ort. Lenfosit sayısı /mm ³	22000	28800	26100
CD49d>%30	2	7	9 (%12,4)
Kappa-Lambda dağılımı	%88 - %12	%88 - %12	%88 - %12
ZAP-70>%20	7	19	26 (%35)
CD38>%20	8	16	24 (%32,4)
Tedavi alan hasta sayısı	16 (%64)	26 (%53)	42 (%56,7)
Tedavisiz izlenen hasta sayısı	9 (%36)	23 (%47)	32 (%43,2)
Ölen hasta sayısı	2 (%8)	4 (%8,1)	6 (%8,1)
Sağ kalan hasta sayısı	23 (%92)	45 (%91,9)	68 (%91,8)

Tablo 4,1. Çalışmaya katılan hastaların demografik ve immünolojik özellikleri

Araştırmaya alınan 74 hastadan 25'i kadın (%35), 49'u erkektir (%65). Tüm hastaların ortalama yaşı 63,1 (en genç 38, en yaşlı 83), median yaşı 63,5 olarak hesaplanmıştır.

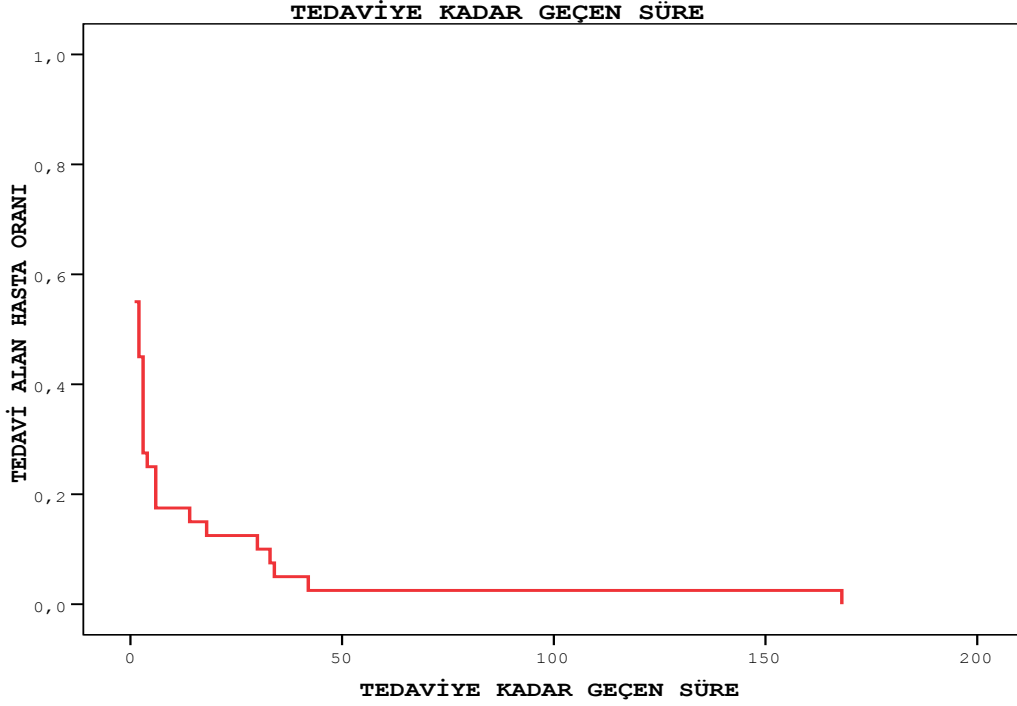
Yapılan değerlendirilmede yaş dağılımı normal bulunmuştur.

Kadınlarda ortalama yaş 62,9, erkeklerde ise 63,1 olarak bulunmuştur. 74 hastadan 66'sı (%90,4) B-KLL, 4'ü (%5,5) SLL, 1'i (%1,4) T-KLL ve 1'i de (%1,4) PLL tanıları almışlardır.

Tanı esnasında, Rai evrelemesine göre, düşük risk grubunda (evre 0 ve 1):30 hasta (12 kadın, 18 erkek) - %40,5, orta risk grubunda (evre 2):25 hasta - %33,7 ve yüksek risk grubunda (evre 3 ve 4):19 hasta - %25,8, bulunmuştur.

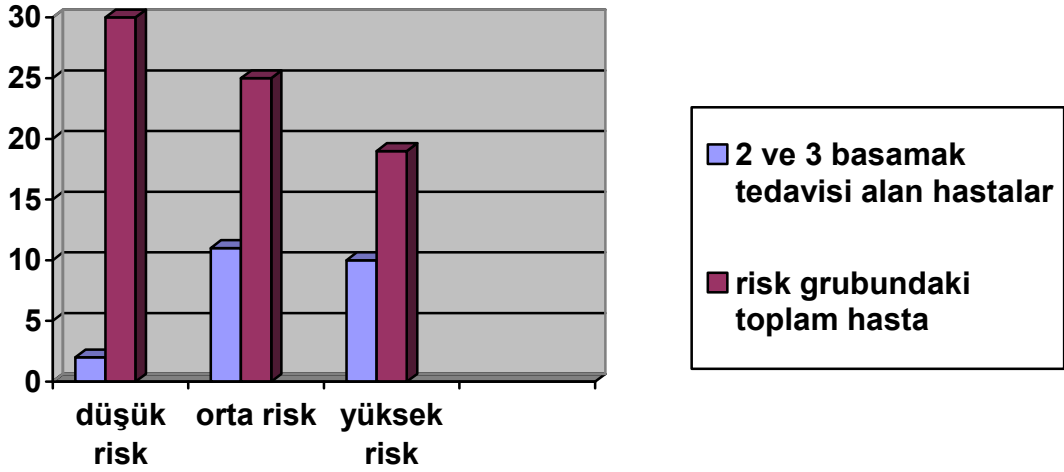
Yine tanı esnasında, mutlak lenfosit sayısına baktığımızda, tüm hastalar için ortalama değer $45080/\text{mm}^3$ (erkekler: $48660/\text{mm}^3$, kadınlar: $38619/\text{mm}^3$), median değer de $26100/\text{mm}^3$ ($3700/\text{mm}^3 - 320000/\text{mm}^3$) olarak bulunmuştur. Kadınlarda median değer $22000/\text{mm}^3$ ($3700/\text{mm}^3 - 202000/\text{mm}^3$), erkeklerde ise $28800/\text{mm}^3$ ($8400/\text{mm}^3 - 320000/\text{mm}^3$) olarak hesaplanmıştır. İki cins arasındaki lenfosit median değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,84$). Lenfosit sayısının tüm hastalar içindeki genel dağılımı incelendiğinde normal olmadığı görülmüştür. Risk gruplarına göre baktığımızda da, mutlak lenfosit sayılarının medyan değerleri arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Düşük risk grubunda medyan lenfosit sayısı: $23600/\text{mm}^3$, orta risk grubunda: $32500/\text{mm}^3$, yüksek risk grubunda ise: $27500/\text{mm}^3$ olarak bulunmuştur ($p=0,11$).

Çalışmaya alınan hastaların ortalama takip süresi 41,7 aydır (4 ay - 240 ay). Takip esnasında 74 hastadan 42'si (%56,7) tedavi alırken, 32'si (%43,3) tedavisiz izlenmiştir. Tedavi alan hastalarda, tedaviye başlama zamanı medyan 2 ay olarak bulunmuştur (en az 1 ay, en çok 168 ay), ancak tedaviye başlama sürelerinin dağılımına bakıldığında normal olmadığı görülmüştür (şekil 4,1).



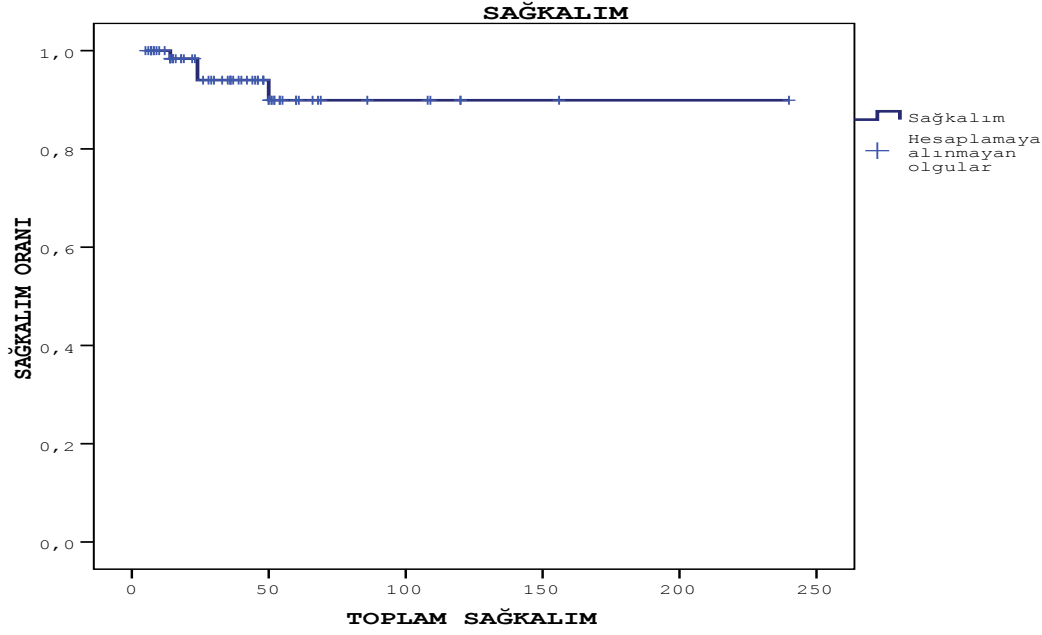
Şekil 4.1 Çalışmaya alınan hastalarda tedaviye kadar geçen sürenin dağılımı. X ekseninde tedaviye kadar geçen zaman ay olarak belirtilmiştir. Y ekseninde, belirli bir zaman dilimi içinde, toplam hastalardan, oran olarak ne kadarı tedavi aldığı belirtilmiştir.

Tedavi alan 42 hastadan 23'ü (%54), 2 veya 3 basamak tedavileri almıştır. Hastalar için toplanan sağ kalım verilerin dağılımı kötü olması ve halen takipte olan yeni tanıli hastaların bulunması nedeniyle, 1 basamak tedavisi alan hastalar ile 2 veya 3 basamak tedavisi alan hastalar arasında toplam sağ kalım farkını gösterecek analiz yapılamamıştır. 2 ve 3 basamak tedavisi alan hastaların risk gruplarına göre dağılımına baktığımızda, düşük risk grubunda 2 hasta (%6), orta risk grubunda 11 hasta (%44), yüksek risk grubunda da 10 hasta (%52) bulunmaktadır. Orta ve yüksek risk gruplarında, ileri basamak tedavisi açısından istatistiksel fark bulunmaz iken ($p=0,12$), düşük risk grubunda, doğal olarak bu oran anlamlı derecede düşük bulunmuştur (orta risk için $p=0,01$, yüksek risk için $p=0,008$) (şekil 4,2).



Şekil 4.2 Risk gruplarına göre 2 ve 3 basamak tedavisi alan hastaların dağılımı. Düşük risk grubunda, orta risk ve yüksek risk grubuna göre, tedavi oranı anlamlı olarak daha düşüktür (OR ile: $p=0,01$, YR ile $p=0,008$)

Takip edilen 74 hastadan, 6'sı (%8,1) hayatını kaybetmiştir. Ölen hastaların hepsi 2 veya 3 basamak tedavisi almış olup, ölüm sebepleri KLL ile ilişkilidir. 4 hasta nötrojenik ateş, 1 hastada tedaviye dirençli Büyük B hücreli Non-Hodgkin Lenfoma transformasyonu gelişmiştir ve 1 hasta da LAP basısına sekonder gelişen üremi nedeniyle ölmüştür. Araştırmada yer alan hastaların toplam sağ kalım $119,09 \pm 40,49$ ay olarak bulunmuştur ancak sağ kalım sürelerinin dağılımı normal olmadığı görülmüştür (şekil 4,3).



Şekil 4,3 Çalışmada yer alan hastaların toplam sağ kalım dağılımı. (+) ile işaretlenen hastalar, yeni tanı almış olup, takip süreleri kısa olması nedeniyle, analiz yöntemi tarafından sansürlenmiştir. Bu hastaların dağılımı hesaplanan hastaların dağılımı ile paraleldir, bu yüzden aynı doğru üzerinde bulunmaktadırlar. X ekseninde toplam sağ kalım ay olarak belirtilmiştir. Y ekseninde, belirli bir zaman dilimi içinde toplam hastalardan sağ kalanların oranı belirtilmiştir.

Tek değişkenli parametreler ile yapılan prognoz analizleri

Çalışma yapılan grubun, hastalıkla ilgili genel parametrelerin belirtilmesinden sonra, prognostik önemi olan bazı belirteçlerin hastalığın seyri üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla tek değişkenli analizler yapılmıştır. Bunlar sırasıyla, hastalığın evresi, CD5+19, CD23+43, Kappa, Lambda, CD49d, ZAP-70 ve CD38 ekspresyonu ve mutlak lenfosit sayısı ile yapılan analizlerdir. Bu analizlerde, immünolojik değişkenlerin, yaşa, cinsiyete ve evreye göre dağılımı bakıldıktan sonra, toplam sağ kalım, tedaviye kadar geçen zaman ve birden fazla tedavi gereksinimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

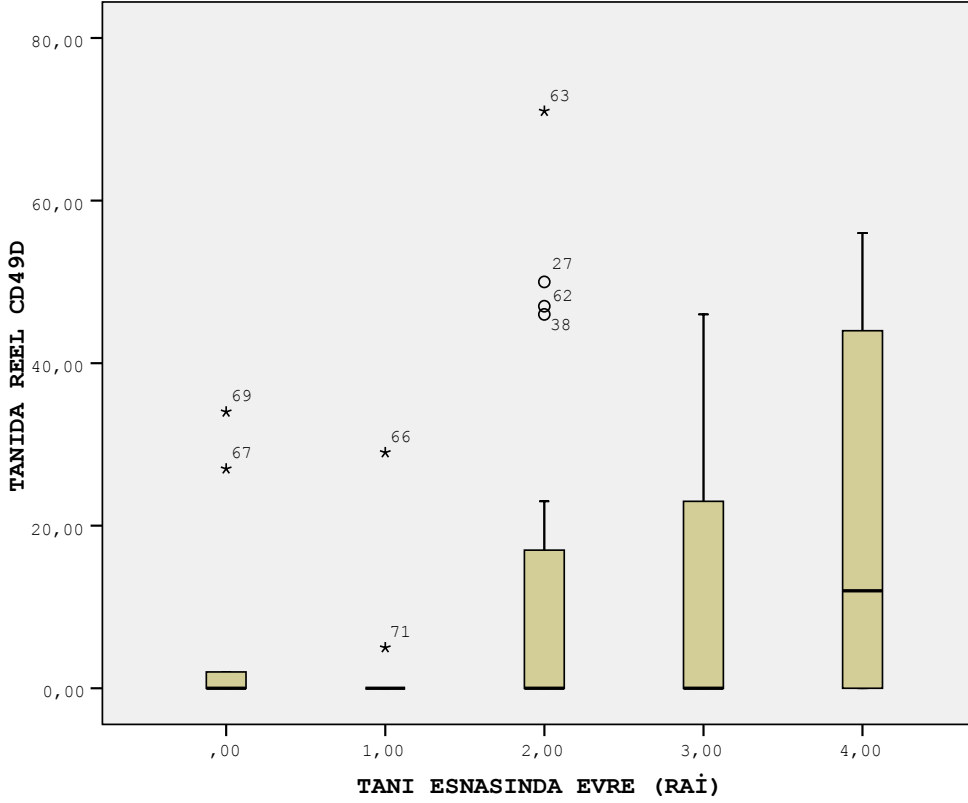
CD49d' nin prognostik belirteç olarak etkisi:

Araştırmaya dâhil edilen 74 hastadan 65'inde bu belirteçe bakılabılmıştır. CD49d yüksek ekspresyonu için, %30 sınır değeri kullanılmıştır. Bunu altındaki değerler ise düşük ekspresyon olarak tanımlanmıştır.

CD49d ekspresyonu yaş ortalamaları ile karşılaştırıldığında, fark olmadığı görülmüştür. CD49d>%30 hastaların yaş ortalaması 52,6 iken, düşük ekspresyonlu hastaların ortalama yaşı 59,3 olarak hesaplanmıştır ($p=0,8$).

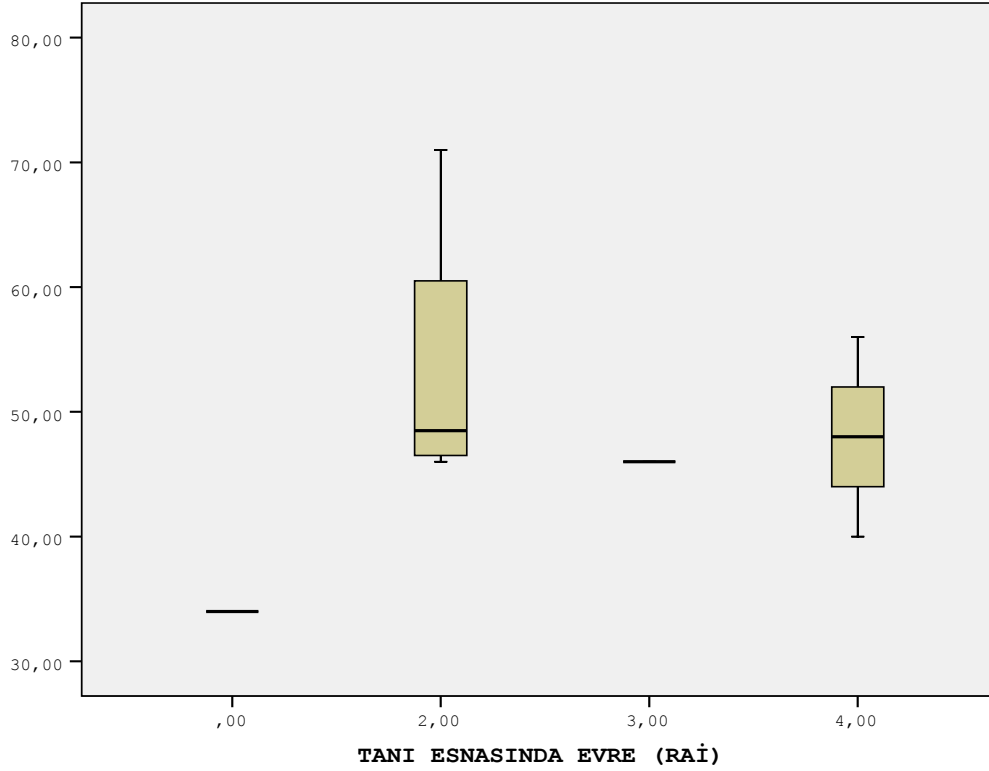
Farklı cinsler arasında CD49d dağılımına bakıldığında CD49d>%30 hasta sayısı az olduğundan (kadın 2, erkek 7) fark saptanmamıştır ($p=0,86$).

Lenfosit sayısının CD49d ekspresyonu ile ilişkisini araştırdığımızda, yüksek ve düşük ekspresyonlu grupların lenfosit ortalamaları arasında fark bulunmasına rağmen istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır. CD49d>%30 grubunda median lenfosit sayısı: 20700/mm³, CD49d<%30 grubunda median lenfosit sayısı: 32650/mm³ bulunmuştur ($p=0,27$). CD49d'nin, evrelere göre dağılımına bakıldığında, evreler arasında fark olmasına rağmen, CD49d ortalamalarındaki yüksek standart sapmalar nedeniyle, bu fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır ($p=0,211$) (şekil 4,4)



Şekil 4,4 CD49d ekspresyon oranlarının evrelere göre dağılımı. Yıldız ve yuvarlak ile gösterilen rakamlar, araştırmada yer alan ve uç değerler taşıyan hastaların çalışma numaralarıdır (yıldız: erkek, yuvarlak: kadın). X ekseninde Rai evreleri belirtilmiştir. Y ekseninde, belirli bir evredeki hastaların reel CD49d oranlarının dağılımı ve standart sapmaları gösterilmiştir.

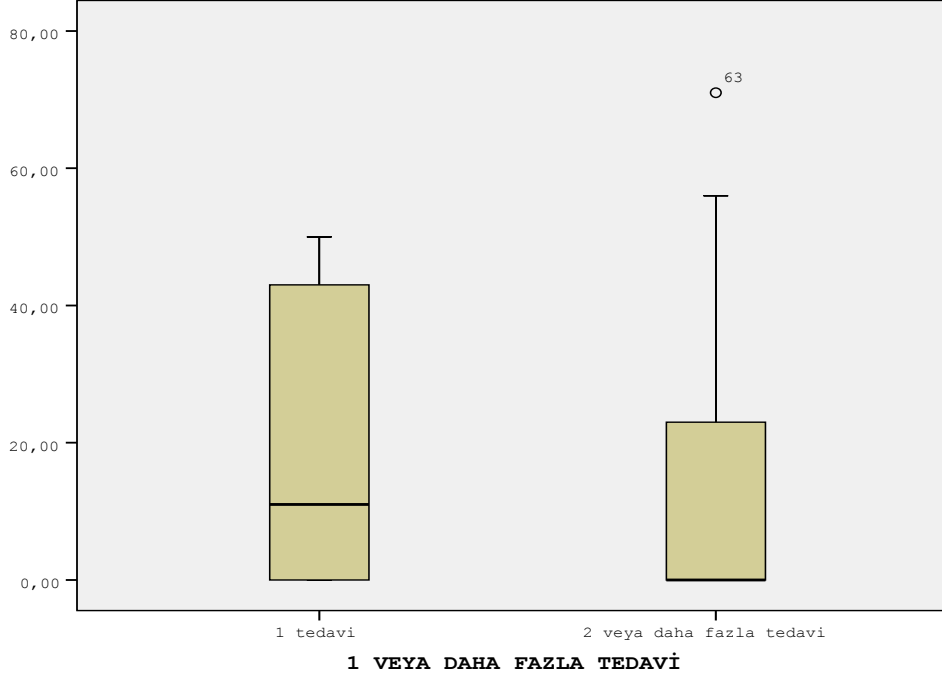
CD49d'nin %30'dan yüksek oranda eksprese edildiği vakaların, evrelere göre dağılımında da farklar bulunamamıştır ($p=0,597$) (şekil 4,5). Ancak CD49d eksprese eden vakaların buldukları ortalama evrelere baktığımızda, %30'dan fazla eksprese edenlerin ortalama evreleri 2,5 (mediyan 3) iken, %30'dan daha az eksprese eden hastaların ortalama evreleri 1,5 (mediyan 1) saptanmıştır. Gözelenen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,028$).



Şekil 4,5 CD49d>%30 olan hastaların Rai evrelerine göre dağılımı. X ekseninde Rai evreleri belirtilmiştir. Y ekseninde, belirli bir evrede bulunan ve CD49d>%30 olan hastaların, ekspresyon oranlarının dağılımı ve standart sapmaları belirtilmiştir.

Çalışmamızda, CD49d'nin tedaviye kadar geçen zaman üzerindeki etkisi bulunmamıştır ($p=0,462$). Aynı şekilde, toplam sağ kalım üzerinde de etkili olmadığı görülmüştür ($p=0,190$). Alt grup olarak, CD49d>%30 olan hastaları incelediğimizde de tedaviye kadar geçen zaman ve toplam sağ kalım açısından herhangi bir korelasyon saptanmamıştır (TKGZ $p=0,203$, TS $p=0,776$).

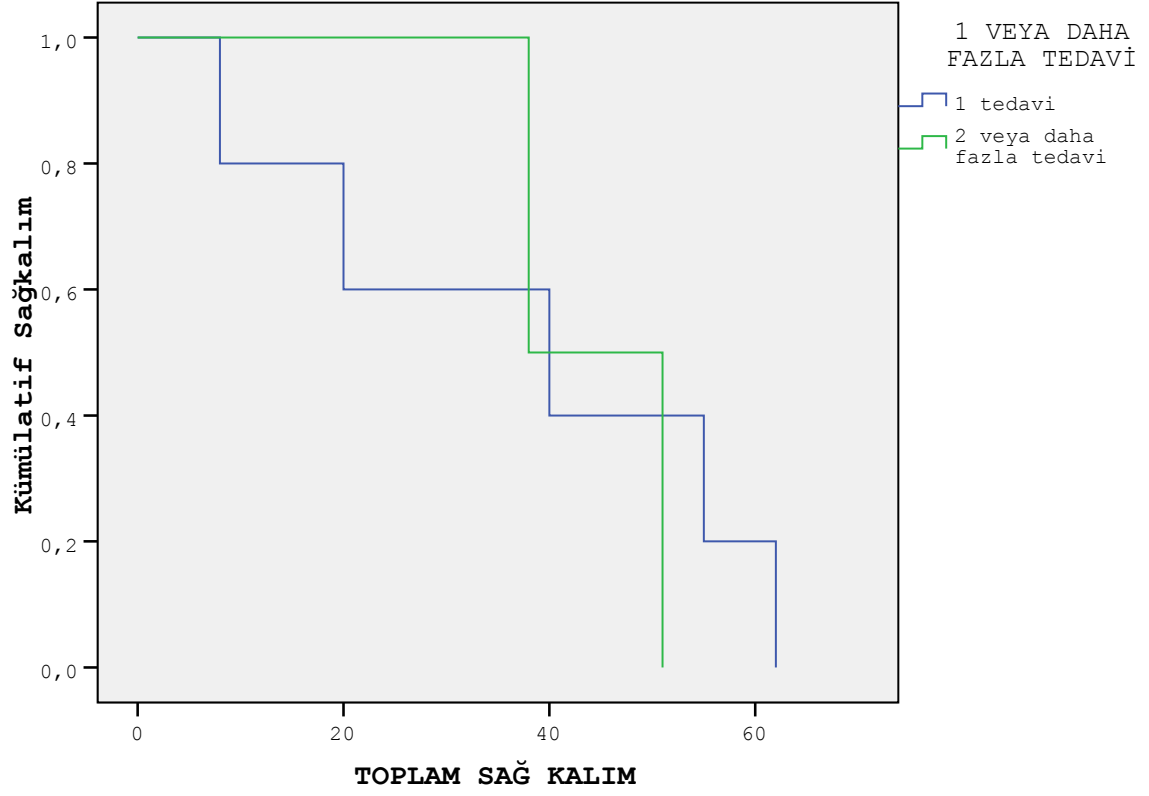
2 ve 3 basamak tedavisi alan hastalar ile sadece 1 basamak tedavisi alan hastalar karşılaştırıldığında, genel CD49d ekspresyon oranlarına göre herhangi bir fark bulunmamıştır (1 basamak tedavi alanlarda ortalama: %18,1 vs 2 ve 3 basamak tedavi alanlardaki ortalama: %12,8, $p=0,465$)(şekil 4,6).



Şekil 4,6 Sadece birinci basamak tedavisi alan hastalar ile 2 veya 3 basamak tedavisi alan hastaların genel CD49d ekspresyon oranlarının karşılaştırılması. İstatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p=0,465$). Yuvarlak ile gösterilen rakam, uç değer taşıyan hastanın çalışma numarasıdır. X ekseninde, hastaların aldıkları tedavi basamağı belirtilmiştir. Y ekseninde, tedavi basamağındaki hastaların genel CD49d oranların dağılımı ve standart sapmaları gösterilmiştir.

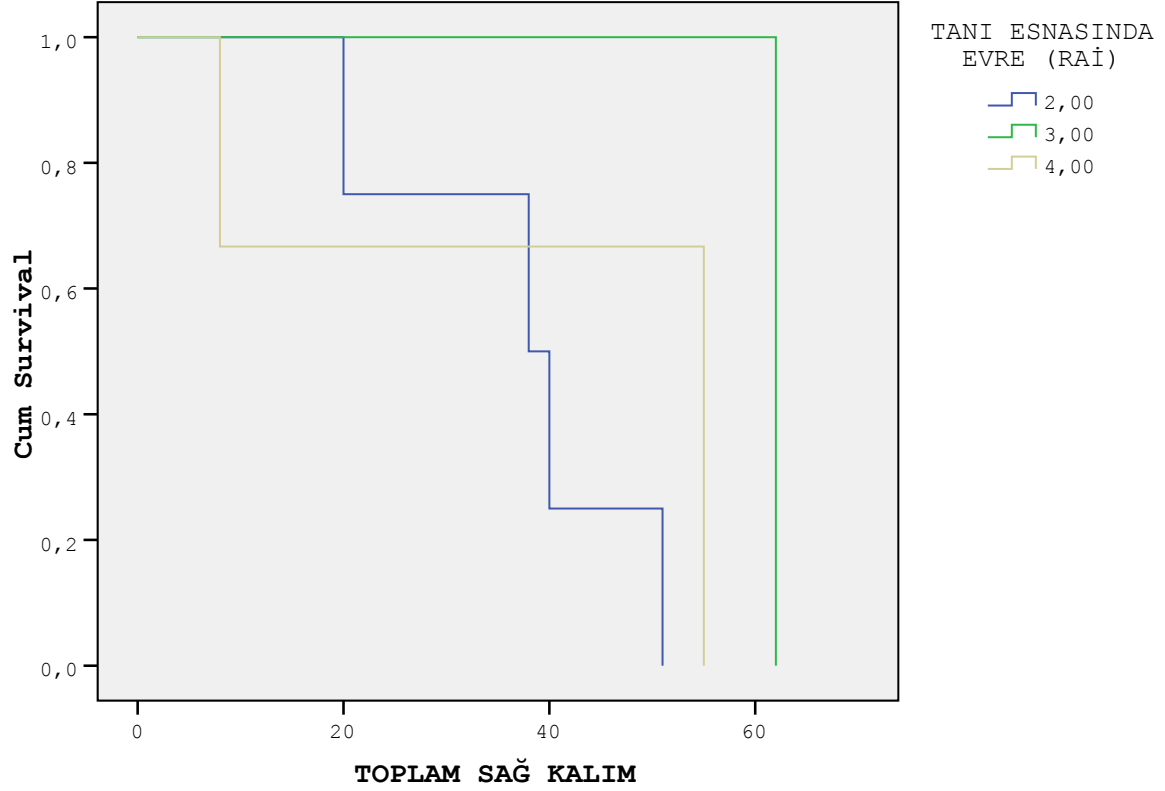
Yalnızca $CD49d > \%30$ hastalar için bu karşılaştırmayı yaptığımızda ise, 2 ve 3 basamak tedavisi alanlarda CD49d ekspresyonu daha yüksek oranda bulunmuştur (1 basamak ortalama: $\%46$ vs 2 ve 3 basamak ortalama: $\%58$). Bulunan bu fark istatistiksel anlamlılık sınırındadır ($p=0,075$) (hasta sayısı az olduğundan analiz programı ile grafik çizilememiştir).

$CD49d > \%30$ olan hastaların aldıkları tedavi basamaklarına göre ayırdığımızda, 2 ve 3 basamak tedavisi alan hastaların toplam sağ kalımlarının ortalamaları, istatistiksel olarak, sınırda anlamlılık derecesinde, daha kısa olduğu görülmüştür ($p=0,066$) (şekil 4.7).



Şekil 4.7 CD49d>%30 olan, bir ve birden fazla tedavi basamağı alan hastalar arasında toplam sağ kalım farkları (1 basamak tedavi alanlarda ortalama: 63,2 ay, vs 2 veya 3 basamak tedavi alanlarda ortalama: 52,1 ay, $p=0,066$). X ekseninde toplam sağ kalım ay olarak belirtilmiştir. Y ekseninde belirli bir zaman dilimi içinde sağ kalan hasta oranı belirtilmiştir.

CD49d>%30 hastaların evreler arasındaki dağılımı ile toplam sağ kalımları karşılaştırdığımızda gözlelenen farklar anlamlılık kazanmamıştır (şekil 4,8)



Şekil 4,8 CD49d>%30 hastaların Rai evrelerine göre dağılımların toplam sağ kalım ile ilişkisi. Evre 0 ve 1 de CD49d>%30 olan hastalar bulunmadığından, grafiğe eklenmemiştir. Anlamlı korelasyon saptanmamıştır ($p=0,16$). X ekseninde toplam sağ kalım ay olarak belirtilmiştir. Y ekseninde belirli bir zaman dilimi içinde sağ kalan hasta oranı belirtilmiştir.

ZAP-70' in prognostik belirteç olarak hastalık seyri üzerindeki etkisi:

Çalışmaya alınan 74 hastadan 40'ında ZAP-70 yüzey proteinine bakılmıştır. Bu hastalardan 26'sında (%67) ZAP-70 > %20 oranında bulunmuştur ve bu değer pozitif değer olarak kabul edilmiştir. ZAP-70(+) olan hastalarda, ortalama ekspresyon oranı %45,7 olarak hesaplanmıştır. ZAP-70(+) hastaların dağılım genişliği normal sınırların dışındadır.

ZAP-70(+) ve (-) gruplarda, yaş ortalamaları kıyaslandığında farklı olduğu ancak istatistiksel anlam taşımadığı görülmüştür (63,4 vs 59,5, $p=0,28$).

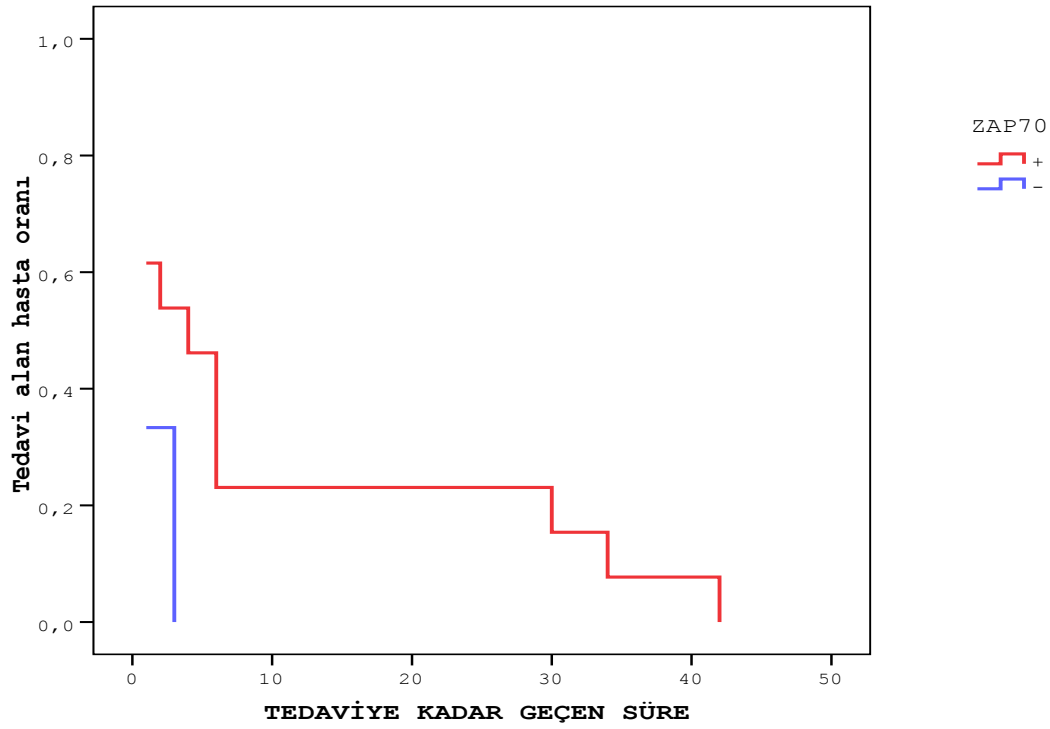
Yaş ve ZAP-70 ekspresyon yoğunluğu arasında da herhangi bir bağlantı bulunamamıştır ($r_s(37)= 0.079, p=0.632$).

Her iki cinste de ortalama ZAP-70 ekspresyonu benzer oranlarda bulunmuştur (erkeklerde %67(+), kadınlarda ise %63(+)).

Rai evrelerine göre ZAP-70 dağılımına baktığımızda, her grupta homojen dağıldığı gözlenmiştir – düşük risk grubunda: 11 hasta (+): %36, orta risk grubunda: 10 hasta (+):%35 ve yüksek risk grubunda 5 hasta (+): %26.

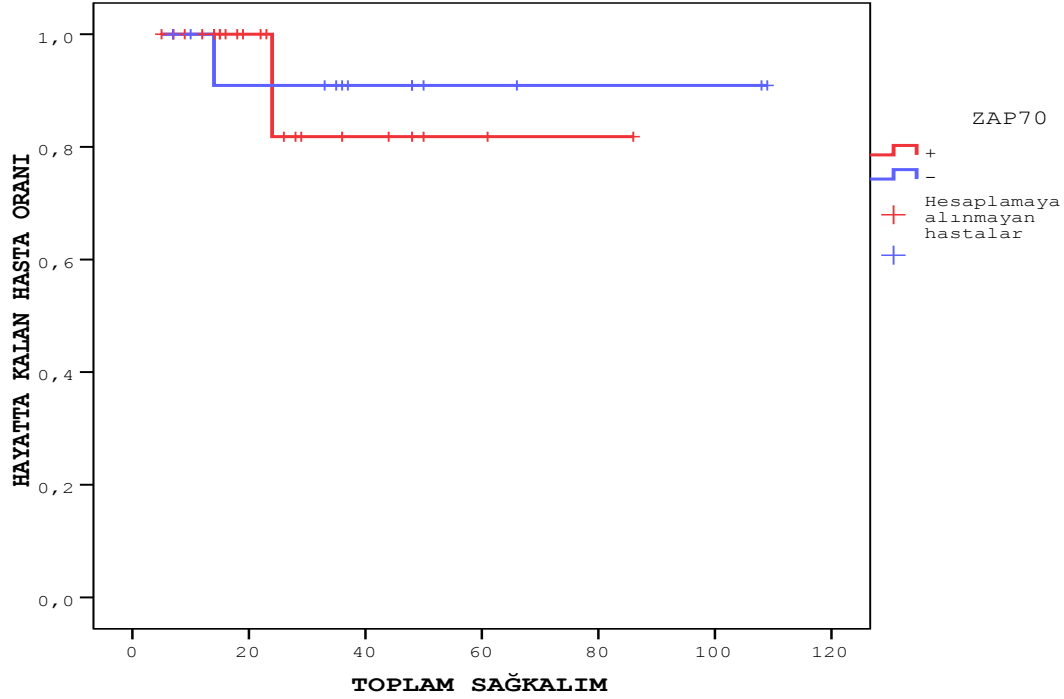
Mutlak lenfosit sayısı ve ZAP-70 ekspresyonu arasında da istatistiksel ilişki saptanamamıştır. ZAP-70(+) hastaların lenfosit ortalaması 30960/mm³ iken ZAP-70(-) hastaların lenfosit sayısının ortalaması 32000/mm³ dir ($p=0,45$).

Çalışmamızda ilginç bir bulgu olarak, ZAP-70(-) hastalarda tedaviye kadar geçen sürenin daha kısa olduğu saptanmıştır (ZAP-70(+) hastalarda ortalama 10,3 ay vs ZAP-70(-) hastalarda ortalama 1,6 ay, *hazard ratio*: 0,1961, %95 güven aralığı: (0,04047- 0,9501) $p=0,04$) (şekil 4,9).



Şekil 4,9 ZAP-70 pozitifliğine göre tedaviye başlama zamanları. X ekseninde tedaviye kadar geçen zaman ay olarak belirtilmiştir. Y ekseninde, belirli bir zaman dilimi içinde, tedaviye başlayan hasta oranları belirtilmiştir.

Yükarıdaki bulguya rağmen, ZAP-70'in ekspresyon yoğunluğu ile tedaviye başlama zamanı arasında bir ilişki bulunamamıştır (korelasyon testi olarak *Spearman's rho test* kullanılmıştır). ZAP-70' in sağ kalım üzerindeki etkisini, her iki grupta da az sayıda ölen hasta (2 vs 1) olduğundan, sağlıklı bir şekilde hesaplanamamıştır (şekil 4.10).



Şekil 4,10 ZAP-70 ekspresyonuna göre sağ kalım eğrileri. Şekilde gözlenen fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Şekilde (+) işareti ile gösterilen hastalar, yeni tanı almış olup, takipleri halen devam etmesi nedeniyle analiz yöntemi tarafından sansürlenmiş olan hastalardır ($p=0,72$). X ekseninde toplam sağ kalım ay olarak belirtilmiştir. Y ekseninde, belirli bir zaman dilimi içinde sağ kalan hasta oranı belirtilmiştir.

ZAP-70(+) olan 26 hastadan, 12'si (%46) tedavisiz izlenirken, 14'ü (%54) tedavi almıştır. Tedavi alan 14 hastadan, 6'sı (%42) sadece 1 basamak tedavisi alırken 8'i (%58) 2 veya 3 basamak tedavisi almıştır. Tedavi alan ve almamış olan hastalar arasında anlamlı sağ kalım farkı bulunmamıştır (72,3 ay vs 76 ay, $p=0,661$). Aldıkları kemoterapi basamağına göre ayırdığımızda da sağ kalım farkı bulunmamıştır (1 basamak hastaları ortalama 74,4 ay vs >1 basamak hastaları ortalama 71,1 ay, $p=0,614$).

CD38' in prognostik belirteç olarak hastalığın seyri üzerindeki etkisi:

Çalışmaya alınan 74 hastadan 42'sinde CD38 yüzey proteinine bakılmıştır. CD38 değerlendirilmesi yapılan hastaların dağılımı normal olarak bulunmamıştır.

CD38 bakılan 42 hastadan 23'ünde (%55), CD38>%20 olarak saptanmıştır. Bu değer CD38 için pozitif değer olarak kabul edilmiştir.

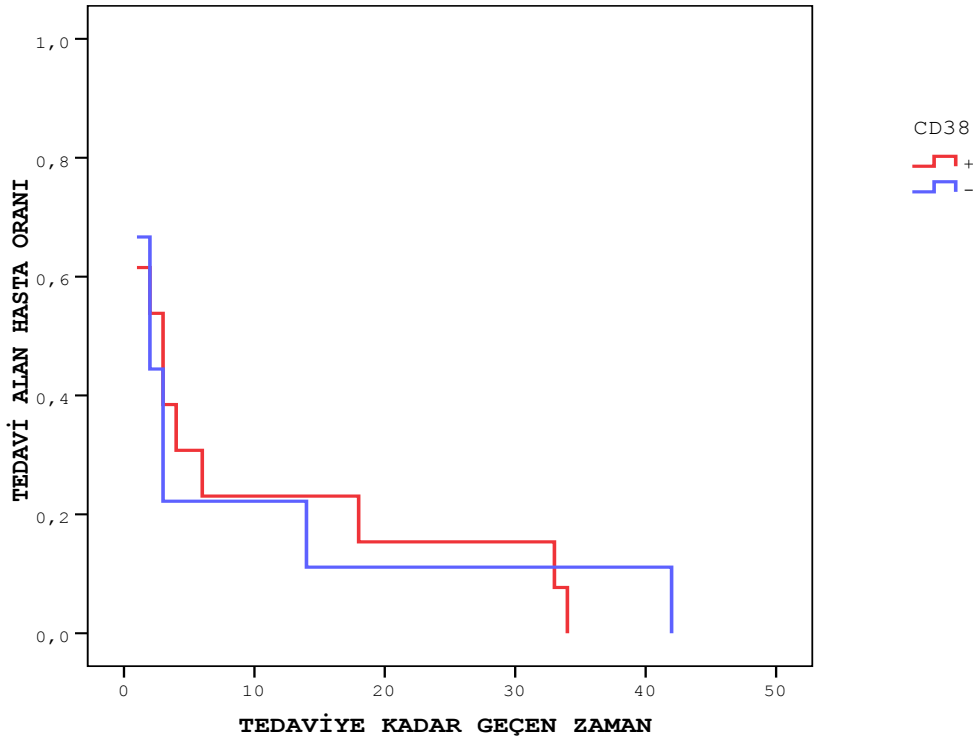
CD38(+) ve CD38(-) grupların yaş ortalamaları karşılaştırıldığında, anlamlı fark olmadığı görülmüştür (65,5 vs 61,8, $p=0,2$). CD38'in ekspresyon yüzdesi ile yaş arasında da bir ilişim bulunamamıştır ($r_s(39)=0.121$, $p=0,4$).

CD38'in dağılımında cinsiyetler arasında fark tespit edilmemiştir. CD38 toplam 12 kadından 8'inde pozitif iken (%66), 30 erkekten 15'inde pozitif saptanmıştır (%50) ($p=0,5$).

Bakılan 42 hastanın risk grubuna göre, C38 dağılımına bakıldığında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır. Düşük risk grubunda CD38 pozitifliği 11 hastada (%36), orta risk grubunda 10 hastada (%40), yüksek risk grubunda ise 2 hastada (%10) pozitif bulunmuştur. İlk değerlendirmede yüksek risk grubunda daha az olarak CD38(+) görünmesine karşın, hasta sayısının az olması nedeniyle anlamlı ilişim sağlanamamıştır ($p=0,9$).

CD38 kuvvetli eksprese eden ve etmeyen gruplar arasında, lenfosit sayısı ortalamaları karşılaştırıldığında fark bulunamamıştır ($28500/\text{mm}^3$ vs $28800/\text{mm}^3$, $p=0,9$). Lenfosit sayısının artması veya azalması ile CD38 ekspresyon oranı arasında da istatistiksel bağlantı bulunamamıştır ($p=0,83$).

Tedaviye kadar geçen zaman açısından değerlendirildiğinde, CD38(+) ve CD38(-) gruplar arasında fark bulunamamıştır (log rank 0,003, $p=0,95$) (şekil 4.11).



Şekil 4.11 CD38 ekspresyonuna göre tedaviye kadar geçen zaman. X ekseninde tedaviye kadar geçen zaman ay olarak belirtilmiştir. Y ekseninde belirli bir zaman dilimi içinde tedaviye başlayan hasta oranı belirtilmiştir.

Yine benzer şekilde CD38 ekspresyon yüzdesi ile tedaviye kadar geçen zaman arasında ilişki bulunamamıştır.

CD38'in, toplam sağ kalım üzerindeki etkisi, bu çalışmada belirlenememiştir. CD38 pozitif ve negatif gruplarda ölen hasta sayısı çok az olduğundan (1 vs 0), medyan sağ kalım hesabı ve Kaplan-Meier eğrisini oluşturmak mümkün olmamıştır.

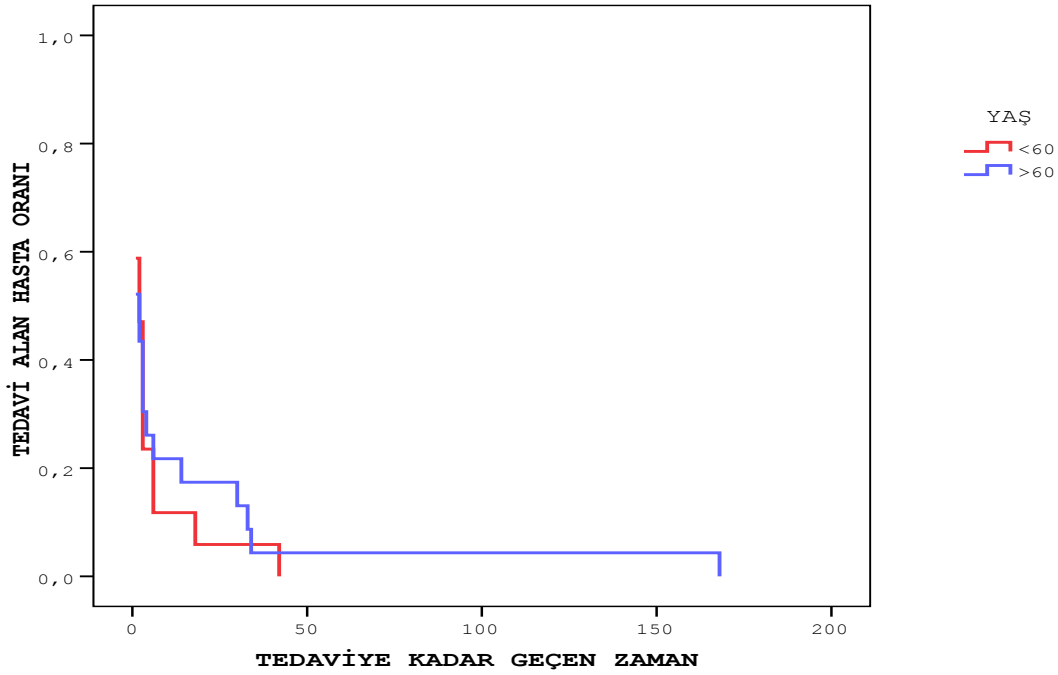
CD38(+) olan 23 hastadan, 10'u (%43) tedavisiz izlenirken, 13'ü (%57) tedavi almıştır. Tedavi alan 13 hastadan 8'i (%61) sadece 1 basamak tedavisi alırken, 5'i (%39) 2 veya 3 basamak tedavileri almıştır. Yaptığımız çalışmada tedavi grupları arasında toplam sağ kalım farkı bulunmamıştır (1 basamak hastaları ortalama 88,2 ay vs >1 basamak hastaları 82,7 ay, $p=0,543$).

Çalışmamızda, genel olarak, ölen hasta sayısının az olması, yeni tanı alan hastaların bulunması ve bazı hastalarda izlem süresi kısa olması nedeniyle toplam sağ kalım ile ilgili istatistiksel hesaplamaların güvenilirliği düşüktür.

Bunun yerine, sağ kalım ile ilgili prognostik faktörlerden, tedaviye kadar geçen zaman üzerine yoğunlaşmıştır.

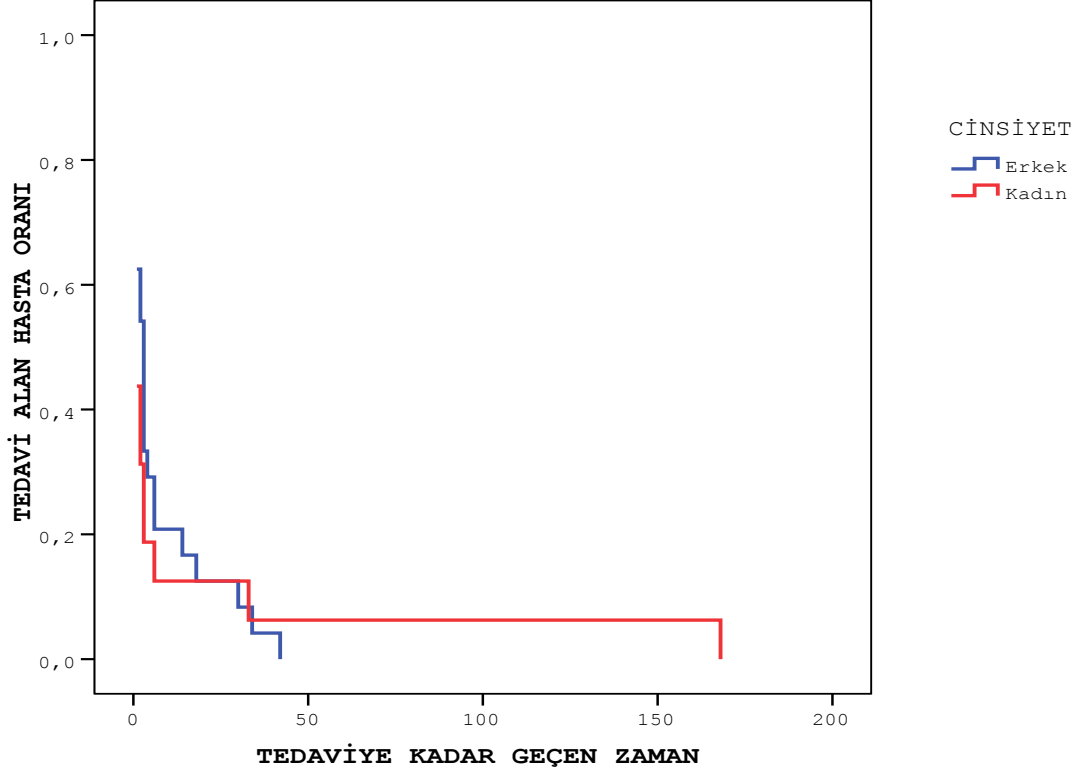
Yukarıdaki araştırmalara ek olarak, yaşın, cinsiyetin, Rai evresinin ve lenfosit sayısının $20000/\text{mm}^3$ 'den yüksek olmasının, tedaviye kadar geçen zaman üzerindeki etkileri de araştırılmıştır.

60 yaş üstünde ve altında olan hastalar arasında, tedaviye kadar geçen zaman açısından bakıldığında fark bulunamamıştır(60 yaş altında ortalama TKGZ:2,4 ay, 60 yaş üstündeki hastalarda TKGZ ortalama 7,4 ay, $p=0,79$) (şekil 4.12)



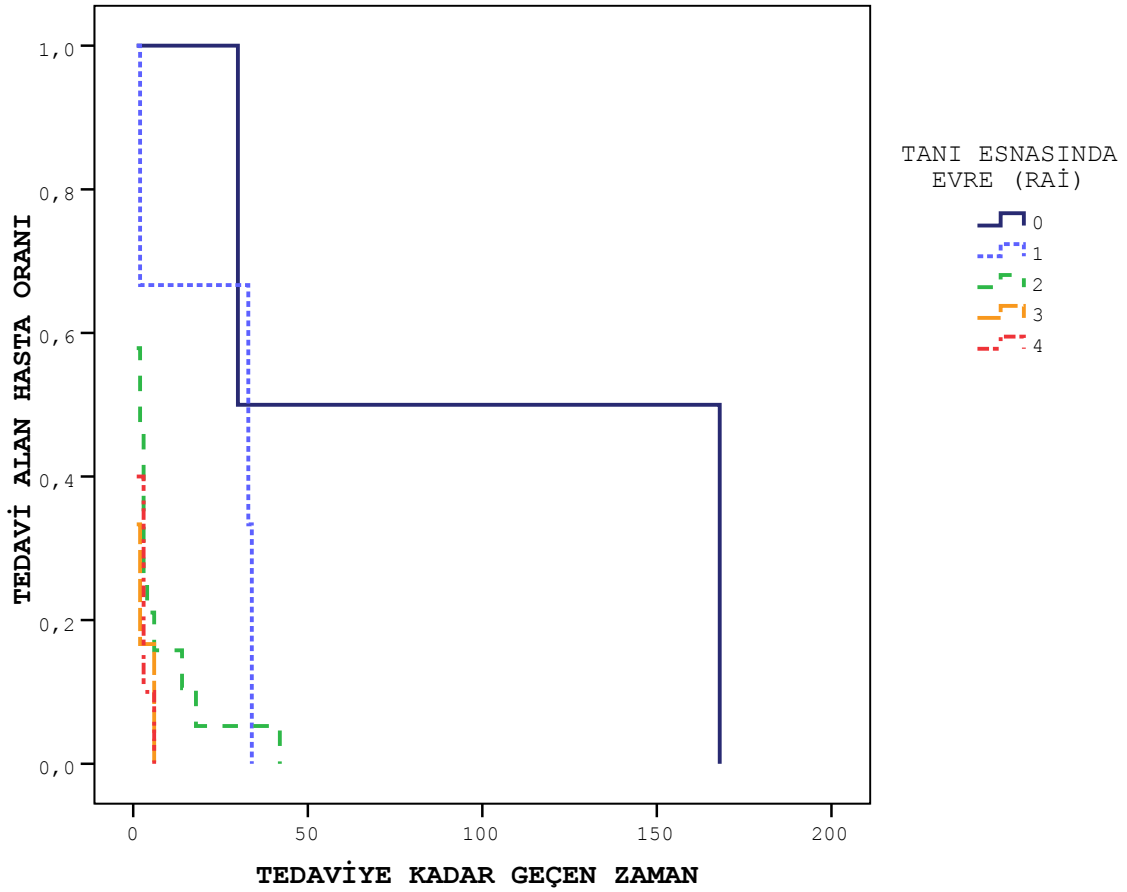
Şekil 4.12 60 yaş üstünde ve altında olan hastalarda tedaviye kadar geçen zaman (60 yaş altında hasta sayısı: 28, 60 yaş üstünde olan hasta sayısı: 46). X ekseninde tedaviye kadar geçen zaman ay olarak belirtilmiştir. Y ekseninde belirli bir zaman dilimi içinde tedaviye başlayan hasta oranı belirtilmiştir.

Kadın ve erkekler arasında da, tedaviye kadar geçen zaman açısından fark saptanmamıştır (kadınlarda ortalama TKGZ: 10,4 ay, erkeklerde ortalama TKGZ:2,3 ay, $p=0,67$) (şekil 4.13).



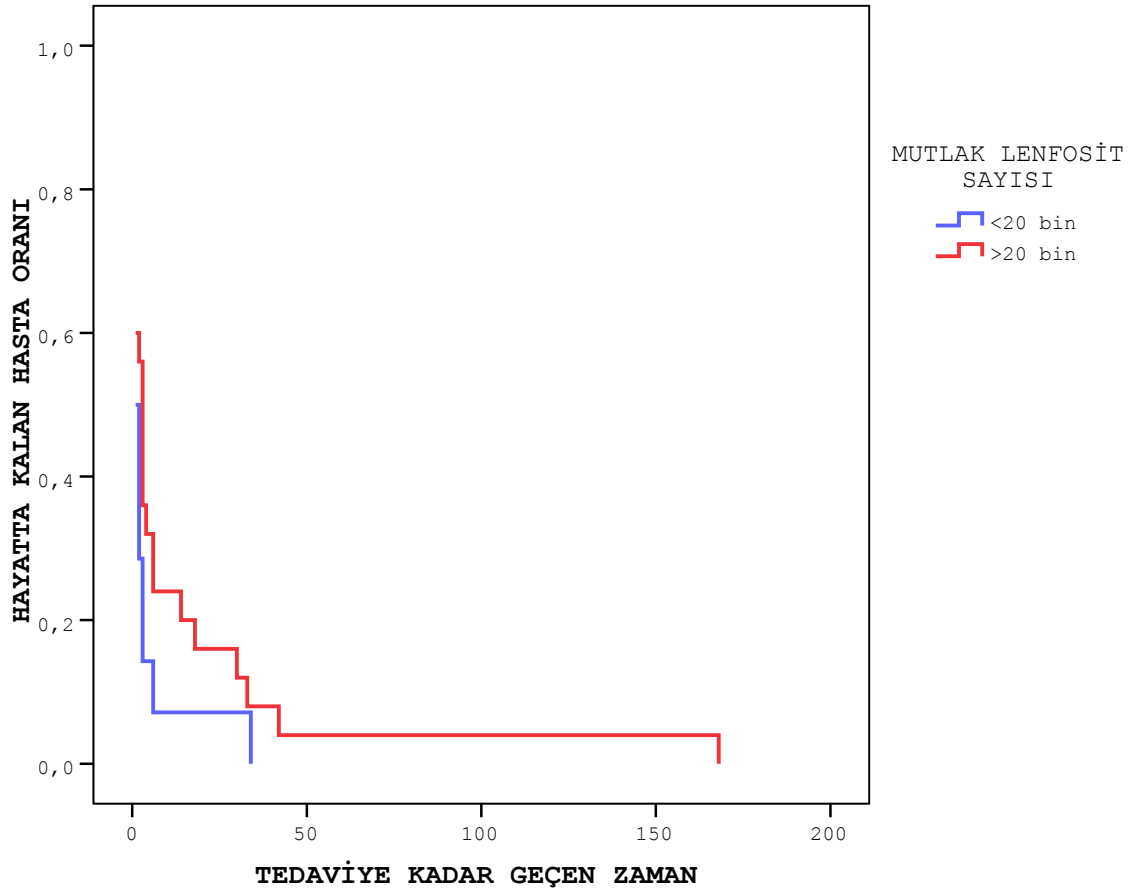
Şekil 4.13 Cinsiyet farkına göre tedaviye kadar geçen zaman (kadın:25, erkek:49). X ekseninde tedaviye kadar geçen zaman ay olarak belirtilmiştir. Y ekseninde belirli bir zaman dilimi içinde tedaviye başlayan hasta oranı belirtilmiştir.

Rai evresine göre tedaviye kadar geçen zamanı değerlendirdiğimizde, beklendiği gibi, anlamlı bir ilişim bulunmuştur ($p=0,02$) (şekil 4.14). Rai evre 0 hastalarda median tedaviye kadar geçen zaman - 33 ay, evre 1 hastalarda - 30 ay, evre 2 hastalarda - 2 ay, evre 3 ve 4 hastalarda ise - 1 aydır.



Şekil 4.14 Rai evresine göre tedaviye kadar geçen zaman (evre 0: 20 hasta, evre 1: 12 hasta, evre 2: 26 hasta, evre 3: 6 hasta, evre 4: 10 hasta). X ekseninde tedaviye kadar geçen zaman ay olarak belirtilmiştir. Y ekseninde belirli bir zaman dilimi içinde tedaviye başlayan hasta oranı belirtilmiştir.

Diğer parametreler ile birlikte, lenfosit sayısının $20000/\text{mm}^3$ 'nin üstünde veya altında olmasının, tedaviye kadar geçen zaman üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Lenfosit sayısının, tedaviye kadar geçen zaman üzerinde herhangi bir etkisi bulunmamıştır (lenfosit sayısı $<20000/\text{mm}^3$ olanlarda ortalama TKGZ:2,3 ay, lenfosit sayısı $>20000/\text{mm}^3$ olanlarda ortalama TKGZ:6,8 ay, $p=0,15$) (şekil 4.15).

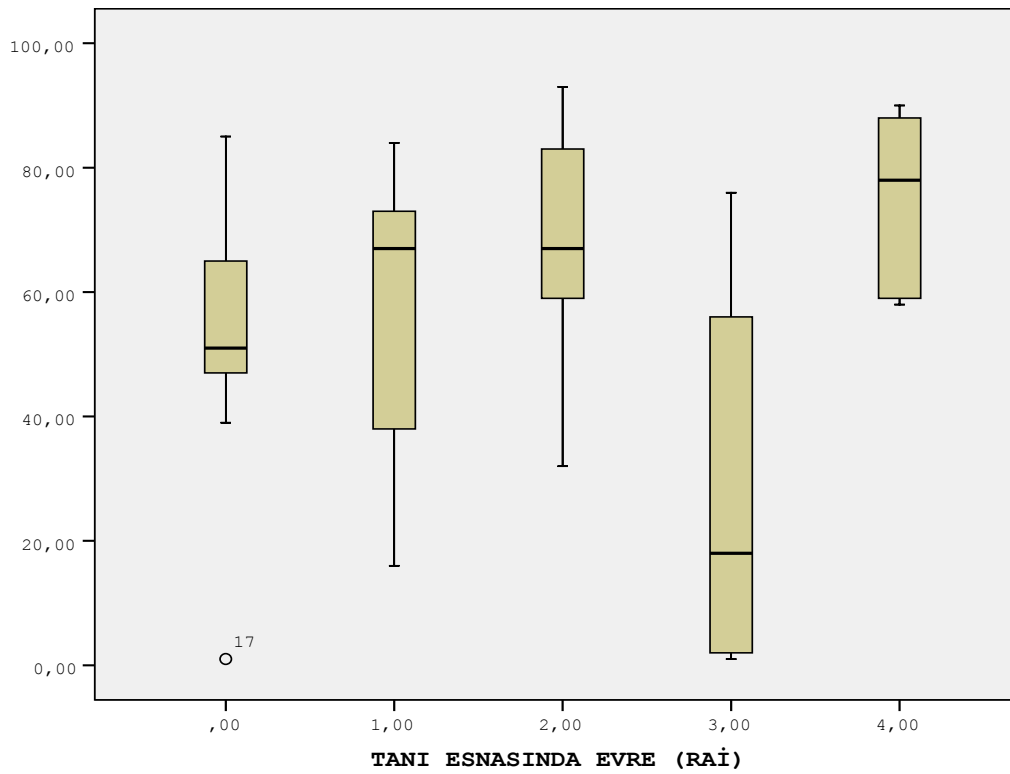


Şekil 4.14 Tanı esnasındaki mutlak lenfosit sayısının, $20000/\text{mm}^3$ 'nin üstünde veya altında olmasının, tedaviye kadar geçen zamanın üzerindeki etkisi ($L_y < 20000/\text{mm}^3$: 27 hasta, $L_y > 20000/\text{mm}^3$: 47 hasta). X ekseninde tedaviye kadar geçen zaman ay olarak belirtilmiştir. Y ekseninde belirli bir zaman dilimi içinde tedaviye başlayan hasta oranı belirtilmiştir.

Yaptığımız çalışmada, iyi bilinen demografik, klinik ve immünolojik prognostik belirteçlerin dışında, tanı için gerekli olan immünofenotipik yüzey belirteçlerin, evrelere göre dağılımları, tedaviye kadar geçen zaman ve toplam sağ kalım üzerindeki etkileri ile birlikte, hastaların almış olduğu tedavi basamakları arasındaki ilişkiye de bakılmıştır.

CD5+19 'un prognoz üzerindeki etkisi

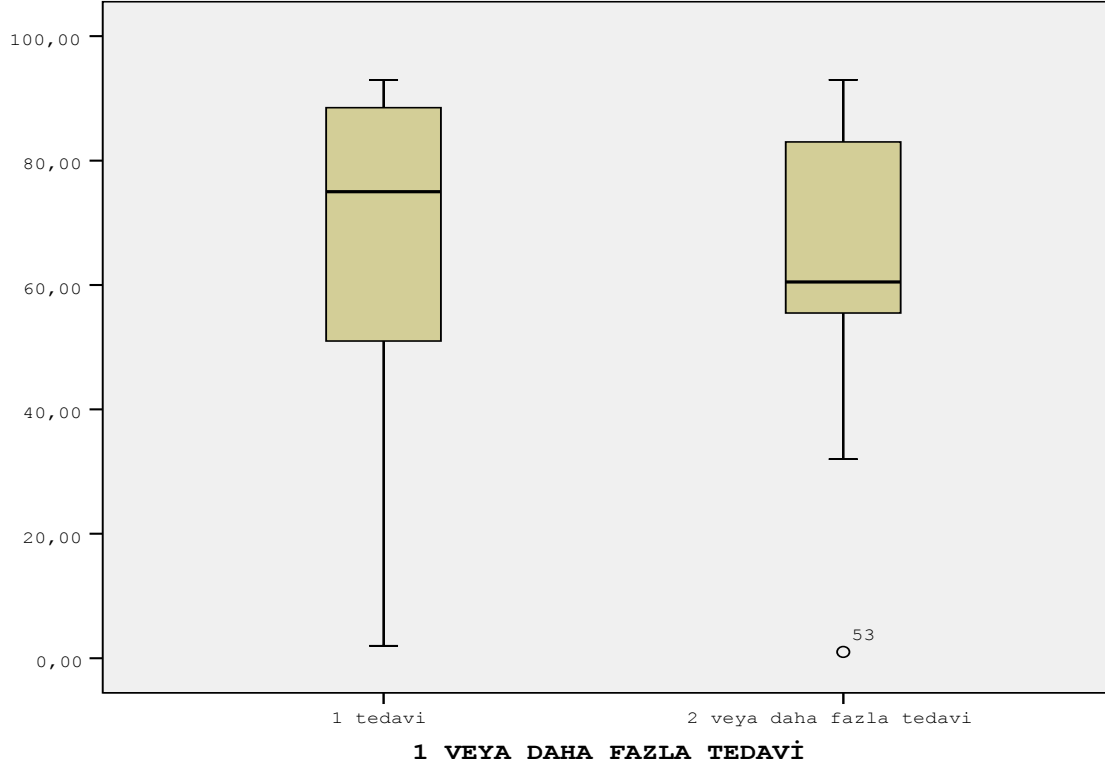
CD5+19 koekspresyonun evrelere göre dağılımına bakıldığında evre 3 hastalarında, evre 2 ve 4'e göre anlamlı olarak daha düşük oranda eksprese edildiği görülmüştür (şekil 2,15)



Şekil 4.15 CD5+19 koekspresyonun Rai evrelerine göre dağılımı. Evre 3 hastalarında evre 2 ve evre 4'e göre anlamlı olarak daha düşük ekspresyon oranı bulunmuştur (evre 3 vs evre 2 $p=0,002$, evre 3 vs evre 4 $p=0,004$). X eksenini Rai evrelerini göstermektedir. Y eksenini belirli bir evrede bulunan hastalardaki CD5+19 ekspresyon oranlarının dağılımını ve standart sapmalarını göstermektedir.

Tedaviye kadar geçen zaman üzerinde CD5+19 koekspresyonun etkisi olmadığı saptanmıştır ($p=0,878$). Benzer şekilde, toplam sağ kalım üzerinde de etkisiz olduğu görülmüştür ($p=0,453$).

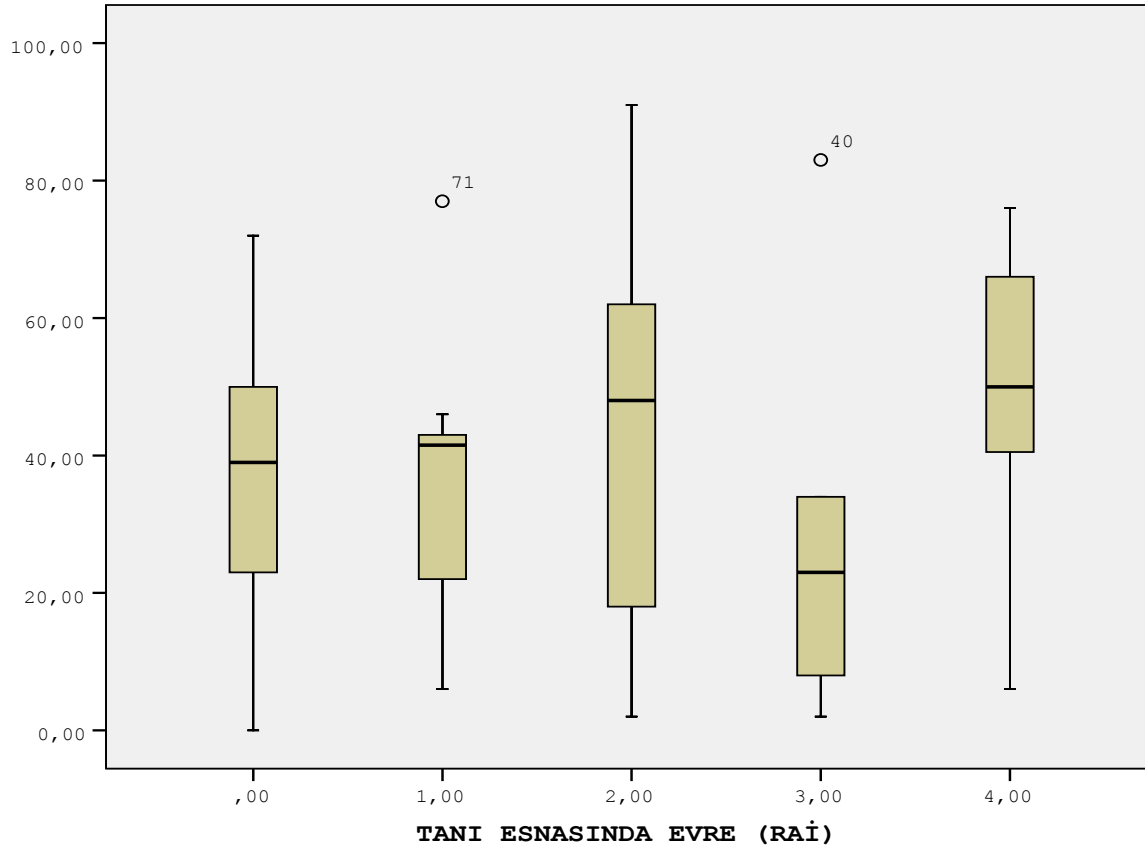
Birinci basamak tedavisi alan hastalar ile 2 veya 3 basamak tedavisi alan hastalar, CD5+19 ekspresyon oranları açısından karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark olmadığı görüldü (şekil 4,16)



Şekil 4.16 Sadece birinci basamak tedavisi alan hastalar ile 2 veya 3 basamak tedavisi alan hastaların CD5+19 ekspresyon oranlarının karşılaştırılması. İstatistiksel olarak fark bulunmamıştır (1 basamak hastaları ortalama: %64,38, >2 basamak hastalarında ortalama: %63,20, $p= 0,893$). Yuvarlak ile gösterilen rakam, uç değer taşıyan hastanın çalışma numarasıdır. X eksenini tedavi basamaklarını göstermektedir. Y eksenini CD5+19 ekspresyon oranlarının dağılımını ve standart sapmalarını göstermektedir. Yuvarlak ile gösterilen rakam uç değer taşıyan hastanın çalışma numarasıdır.

CD23+43 'un prognoz üzerindeki etkisi

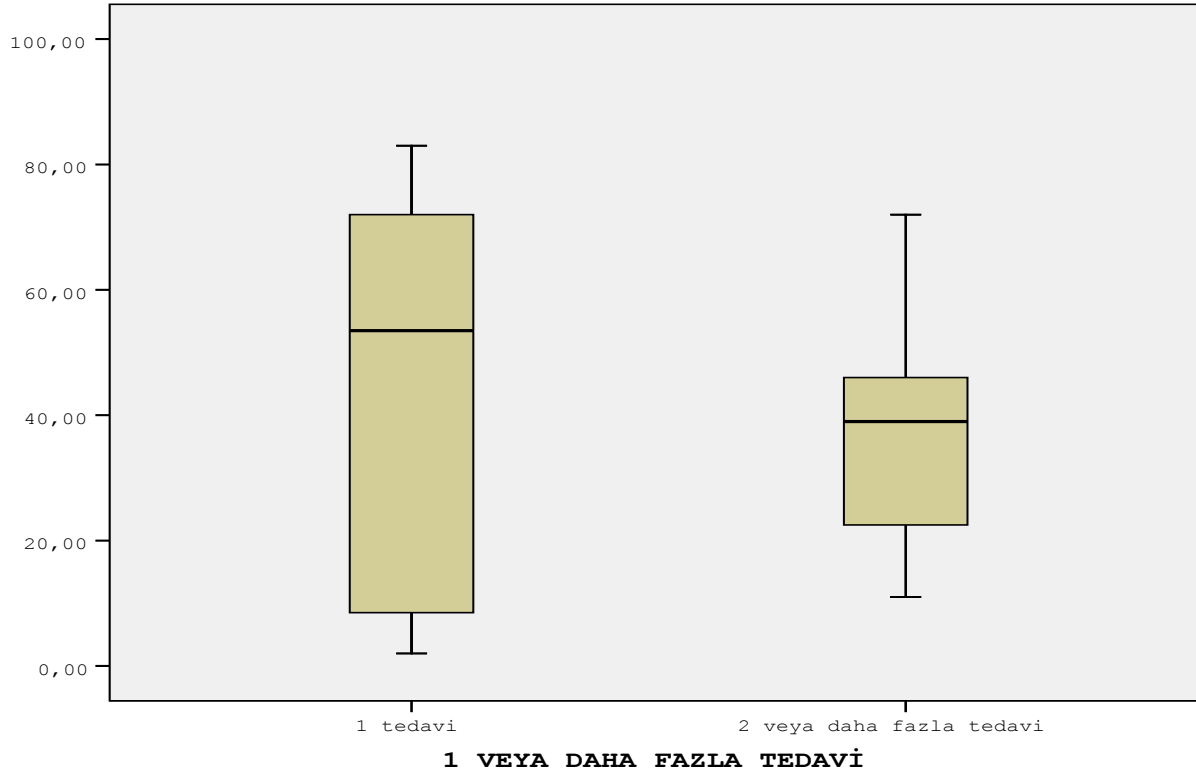
CD23+43 koekspresyonun evrelere göre dağılımına bakıldığında evreler arasında anlamlı ekspresyon farkı bulunmamıştır (şekil 4,17)



Şekil 4.17 CD23+43 koekspresyon oranlarının evrelere göre dağılımı. İstatistiksel fark bulunmamıştır ($p=0,55$). X eksenini Rai evrelerini göstermektedir. Y eksenini CD23+43 ekspresyon oranlarının dağılımını ve standart sapmalarını göstermektedir.

Çalışmamızda, CD23+43 koekspresyonun tedaviye kadar geçen zaman ve toplam sağ kalım üzerinde etkisi olmadığı saptanmıştır (TKGZ $p=0,157$, TS $p=0,129$).

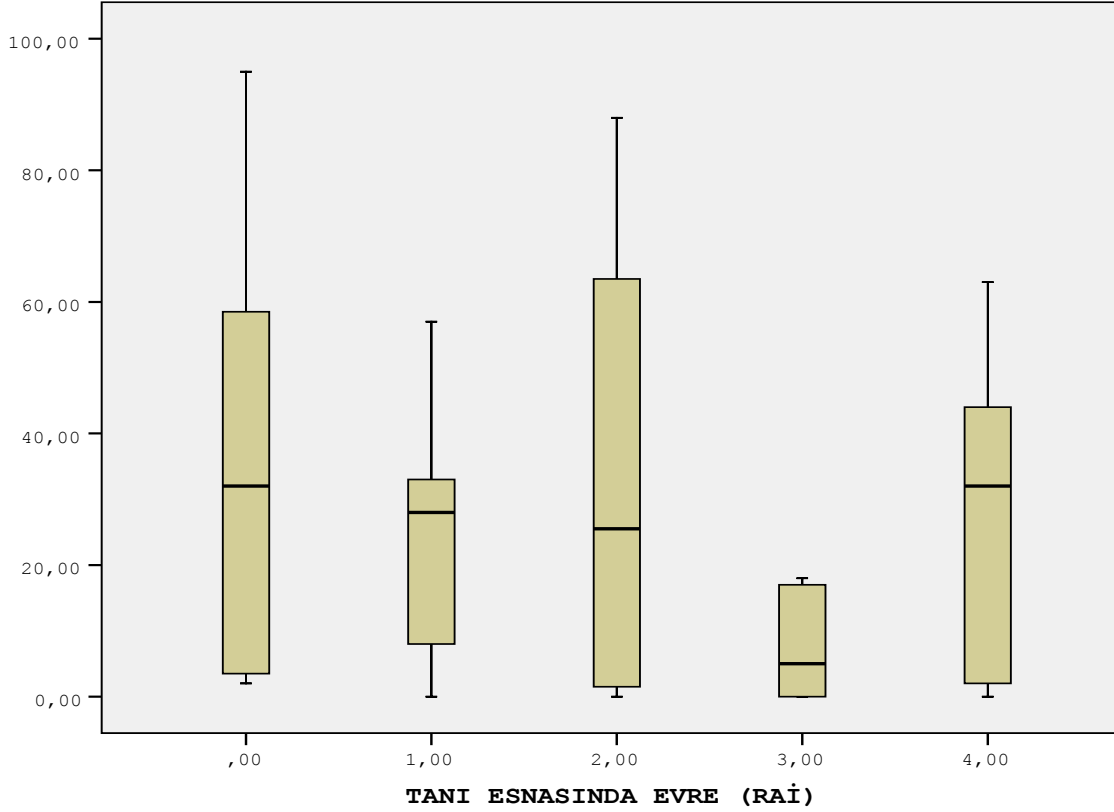
Birinci basamak tedavisi alan hastalar ile 2 veya 3 basamak tedavisi alan hastalar, CD23+43 ekspresyon oranları açısından karşılaştırıldığında gözlenen fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır (şekil 4,18).



Şekil 4,18 Sadece birinci basamak tedavisi alan hastalar ile 2 veya 3 basamak tedavisi alan hastaların CD23+43 ekspresyon oranlarının karşılaştırılması. İstatistiksel olarak fark bulunmamıştır (1 basamak hastaları ortalama: %45,56, >2 basamak hastalarında ortalama: %36,74, $p=0,292$). X eksenini, tedavi basamaklarını göstermektedir.Y eksenini CD23+43 ekspresyon oranlarının dağılımını ve standart sapmalarını göstermektedir.

Hücre yüzeyindeki kappa hafif zincir ekspresyonun prognoz üzerindeki etkisi

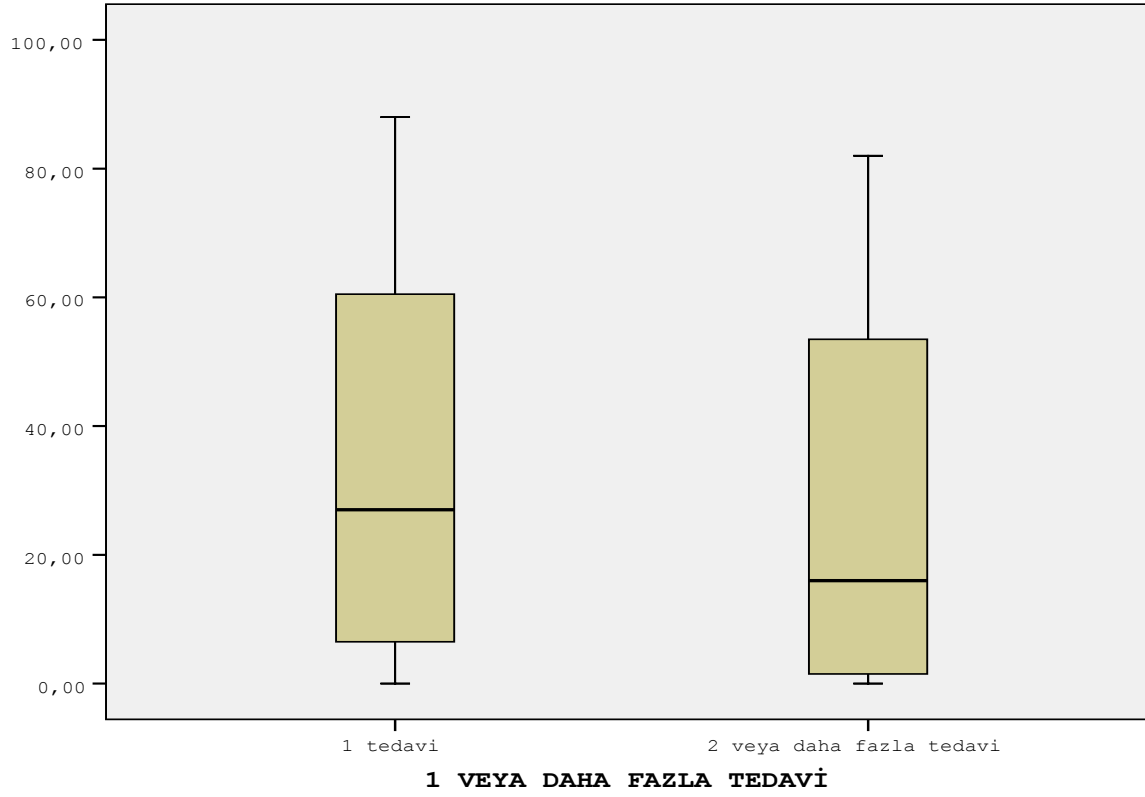
Kappa hafif zincir ekspresyon oranların, evrelere göre homojen dağıldığı ve evreler arasında anlamlı ekspresyon farkı olmadığı görülmüştür (şekil 4,19)



Şekil 4.19 Kappa hafif zincir ekspresyon oranların Rai evrelerine göre dağılımı. Evreler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,347$). X eksenini Rai evrelerini göstermektedir. Y eksenini kappa ekspresyon oranların dağılımı ve standart sapmalarını göstermektedir.

Yaptığımız araştırmada, kappa hafif zincir ekspresyonun, tedaviye kadar geçen zaman ve toplam sağ kalım üzerinde etkisiz olduğu gözlenmiştir (TKGZ $p=0,830$, TS $p=0,966$).

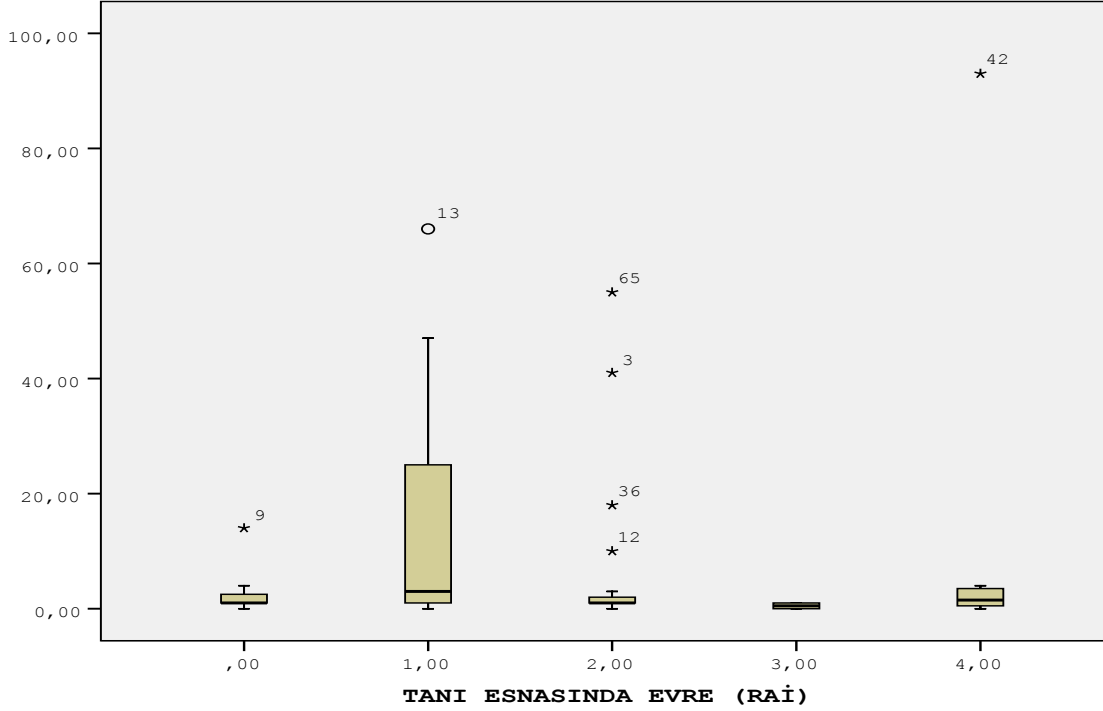
Birinci basamak tedavisi alan hastalar ile 2 veya 3 basamak tedavisi alan hastalar, kappa hafif zincir ekspresyon oranları açısından karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark olmadığı görüldü (şekil 4,20)



Şekil 4.20 Sadece birinci basamak tedavisi alan hastalar ile 2 veya 3 basamak tedavisi alan hastaların kappa hafif zincir ekspresyon oranlarının karşılaştırılması. İstatistiksel olarak fark bulunmamıştır (1 basamak hastaları ortalama: %35,00, >2 basamak hastalarında ortalama: %28,60, $p=0,541$). X eksenini tedavi basamağını göstermektedir. Y eksenini kappa ekspresyon oranlarının dağılımı ve standart sapmalarını göstermektedir.

Hücre yüzeyindeki lambda hafif zincir ekspresyonunun prognoz üzerindeki etkisi

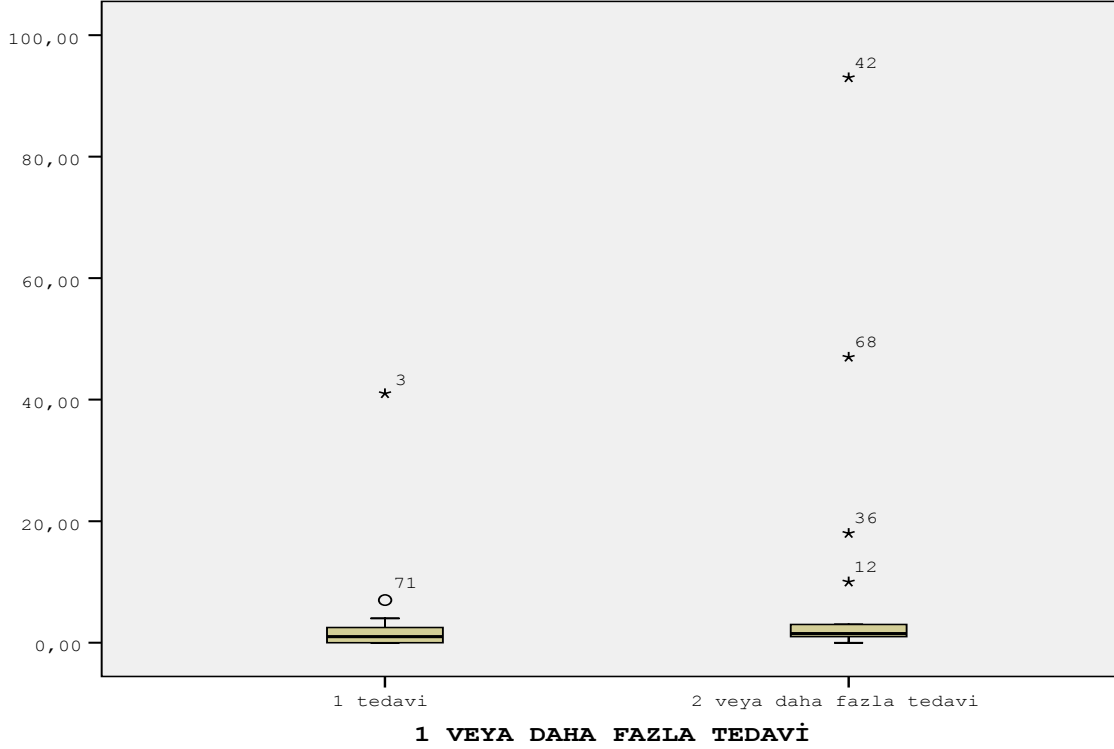
Yüzey lambda ekspresyon oranlarının evrelere göre dağılımına bakıldığında, evreler arasında anlamlı fark olmadığı saptanmıştır (şekil 4,21)



Şekil 4.21 Yüzey lambda hafif zincir ekspresyon oranlarının, Rai evrelerine göre dağılımı. Anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,26$). Yıldız ve yuvarlak işareti ile gösterilen rakamlar, uç değerler gösteren, hastaların çalışma numaralarıdır (yıldız: erkek, yuvarlak: kadın). X eksenini Rai evrelerini göstermektedir. Y eksenini lambda ekspresyon oranlarının dağılımını ve standart sapmalarını göstermektedir.

Çalışmamızda, lambda hafif zincir ekspresyonunun tedaviye kadar geçen zaman üzerinde etkisi olmadığı ($p=0,505$), ancak toplam sağ kalım ile pozitif yönde ilişkili olduğu gözlenmiştir ($p=0,023$). Hastalardan sadece 6'sısı, lambda hafif zinciri %20'den yüksek oranda eksprese etmektedir. Bu nedenle, lambda ekspresyon oranının, toplam sağ kalım üzerinde olumlu etkide bulunduğunu söylemek doğru değildir.

Birinci basamak tedavisi alan hastalar ile 2 veya 3 basamak tedavisi alan hastalar, lambda hafif zincir ekspresyon oranları açısından karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark olmadığı görüldü (şekil 4,22)



Şekil 4.22 Sadece birinci basamak tedavisi alan hastalar ile 2 veya 3 basamak tedavisi alan hastaların lambda hafif zincir ekspresyon oranlarının karşılaştırılması. İstatistiksel olarak fark bulunmamıştır (1 basamak hastaları ortalama:% 4,13, >2 basamak hastalarında ortalama: %10,28, $p=0,356$). Yıldız ve yuvarlak ile gösterilen rakamlar, araştırmada yer alan ve uç değerler taşıyan hastaların çalışma numaralarıdır (yıldız: erkek, yuvarlak: kadın). X eksenini tedavi basamaklarını belirtmektedir Y eksenini lambda ekspresyon oranlarının dağılımı ve standart sapmalarını göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kronik Lenfositik Lösemi, batı ülkelerde olduğu gibi, ülkemizde de sık rastlanan bir hastalıktır. Özellikle yaşlı kişilerde, önemli bir sağlık sorunudur. Genellikle yavaş seyirli bir hastalık olmasına rağmen, tedavi gerektiren hastalarda, kemoterapinin yan etkileri, hastalığın otoimmün bulguları ve enfeksiyon ile ilgili komplikasyonlar önemli morbidite ve mortalite sebepleridir.

Sık rastlanan bir hastalık olması nedeniyle, dünyada, bu hastalığın tanısı, prognozu ve tedavisini aydınlatmak amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır. Yapılan araştırmaların sayesinde, günümüzde, KLL ve alt tiplerinin tanısı, kolayca konabilmektedir. Tanı ile birlikte, hastalığın gelecekteki seyrini daha net belirlemek için, çeşitli prognostik faktörlerin tanımlanması (evre, sitogenetik ve immünofenotipik özellikler vb.) son derece önemlidir.

Gelişmiş ülkelerdeki tıp uygulamalarında, farklı yayınlarda yayımlanan tanı ve tedavi kılavuzlarına göre, son derece iyi oturmuş yöntem ve gereçler ile KLL hastalarının, tanı esnasında prognostik faktörleri belirlenmekte ve buna göre hasta için en iyi takip ve tedavi yöntemi seçilebilmektedir.

Ülkemizdeki uygulamalar için, ne yazık ki, bu geçerli değildir. KLL hastalığının tanısı ve prognostik değerlendirilmesi için, gelişmiş immünolojik ve sitogenetik tetkikler gerekmektedir. Bu tekniklerin yaygın olmaması nedeniyle, genellikle KLL hastalarının tanı esnasında eksik değerlendirilebilmektedir.

KLL ile ilgili bilgiler, tamamen yabancı kaynaklı yayınlardan elde edilebilmektedir. Bu kaynaklardaki hasta toplumu, bizim hasta toplumumuzdan birçok açıdan farklıdır, bu nedenle hastalarımıza uyguladığımız tanı ve takip protokolleri her zaman uyumlu olmamaktadır.

Birçok konuda olduğu gibi, ülkemizdeki bazı hastalıklar için yeterli sayıda kayıtlı veri bulunmamaktadır. Çalışmamızın amaçlarından biri de bu verilere katkıda bulunmaktır.

Araştırmamıza, katılan hasta grubunu değerlendirildiğimizde, yaş ortalamalarının batı kaynaklarına benzer olduğu görülmüştür (63,1). Kadın/erkek oranı da benzerdir (1:2). Tanı esnasındaki risk gruplarına göre değerlendirdiğimizde ise, hastaların dağılımı, düşük risk grubunda %40, orta risk grubunda %33, yüksek risk grubunda ise %25 olduğu saptanmıştır. Rai ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada ise bu dağılım düşük risk grubunda %31, orta risk grubunda %61, yüksek risk grubunda da %8 olarak

bulunmuştur. Burada dikkati çeken nokta, orta risk grubundaki hasta oranı, batıdaki hastalara göre yarısı kadar olduğu, yüksek risk grubunda ise üç katı daha fazla olmasıdır.

Düşük risk grubundaki hastalar genellikle asemptomatik olup, rutin kan tetkiklerinde tesadüfen saptanan lenfosit ile tanı konmaktadır. Bunun yanı sıra, orta risk grubundaki hastaların genellikle belirgin semptom ve bulguları olmaktadır. Ülkemizde muhtemelen bu hastaların tanısı daha geç konmaktadır ve bu yüzden, orta risk grubundaki hastaların bir kısmı tanı konana kadar, hastalıkları ilerleyip, yüksek risk grubuna girdikleri düşünülebilir.

Başka açıdan baktığımızda, yüksek risk kriterlerini, hastalar için uyguladığımızda ortaya bazı yanlış değerlendirmeler çıkabilir. Rai evre 3 ve 4 hastalardaki en önemli bulgu anemi ve trombositopenidir. Buradaki sitopeniler, otoimmün veya başka sistemik hastalığa bağlı olmaması gerekmektedir. Hastalarımızın değerlendirilmesinde, özellikle anemi açısından sıkıntılar yaşanmaktadır. Hastalarımızda gözlenen anemi, yaşlılığa, kardiyovasküler sorunlara, demir eksikliğine veya kronik hastalık anemisi gibi başka sebeplere bağlı olabilir. Genellikle ilk değerlendirme esnasında hastaların diğer semptomlarına ağırlık verilir (lenfadenopati, splenomegali, B semptomları) ve anemi araştırılmadan, hastalar ileri evre olarak kabul edilebilmektedir. Bu noktada, kemik iliği biopsisi bize yardımcı olabilir. Anemi ile gelen KLL hastaların, kemik iliği biopsisinde, diffüz lenfoid infiltrasyon, eritroid baskılanma ve yeterli demir depoları olduğu gösterilirse, bu hastalardaki anemi büyük olasılıkla KLL'ye sekonder gelişmiştir.

Hastalardaki trombositopeni de benzer şekilde yeterince araştırılmamaktadır. Otoimmün trombositopeniyi tanımlamak için, günümüzde pratik kullanımı olabilecek herhangi bir test yoktur. Ancak, kemik iliğindeki megakaryopoez baskılanması, bize fikir verebilir.

Sonuç olarak, KLL kliniği ile başvuran hastalarda, anemi ve/veya trombositopeni saptandığında, ileri evre olarak sınıflandırmadan önce, dikkatle değerlendirilmeleri gerektiği aşikârdır.

Dikkati çeken diğer bir bulgu, hastalarımızın yüksek ortalama lenfosit değerleridir. Oscier ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, İngiltere'de ki KLL hastalarının ilk tanı esnasında ortalama $20000/mm^3$ 'den düşük düzeyde lenfosit sayılarının olduğu bildirmiştir (185,186). Çalışmamızda ortalama lenfosit sayısının çok yüksek olması ($45080/mm^3$) ve lenfosit sayılarının dağılımı bozuk olması nedeniyle, medyan değerler dikkate alınmıştır ($26100/mm^3$). Yine de bu lenfosit sayısı, batı toplumların ortalamalarına göre yüksektir.

Lenfosit sayısının yüksek olması (özellikle de $40000/\text{mm}^3$ 'nin üzerinde), sağ kalımı olumsuz etkilediği bilinmektedir (186). Çalışmamızda bu bilgiyi doğrulayacak veri bulunamamıştır. Lenfosit sayısının, toplam sağ kalım, tedaviye kadar geçen zaman, CD49d, ZAP-70 ve CD38 ekspresyonu ile ilgisi gösterilememiştir.

Çalışmamızda, prognostik olarak önem taşıyan bazı immünofenotipik belirteçlerin, hastalığın seyri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

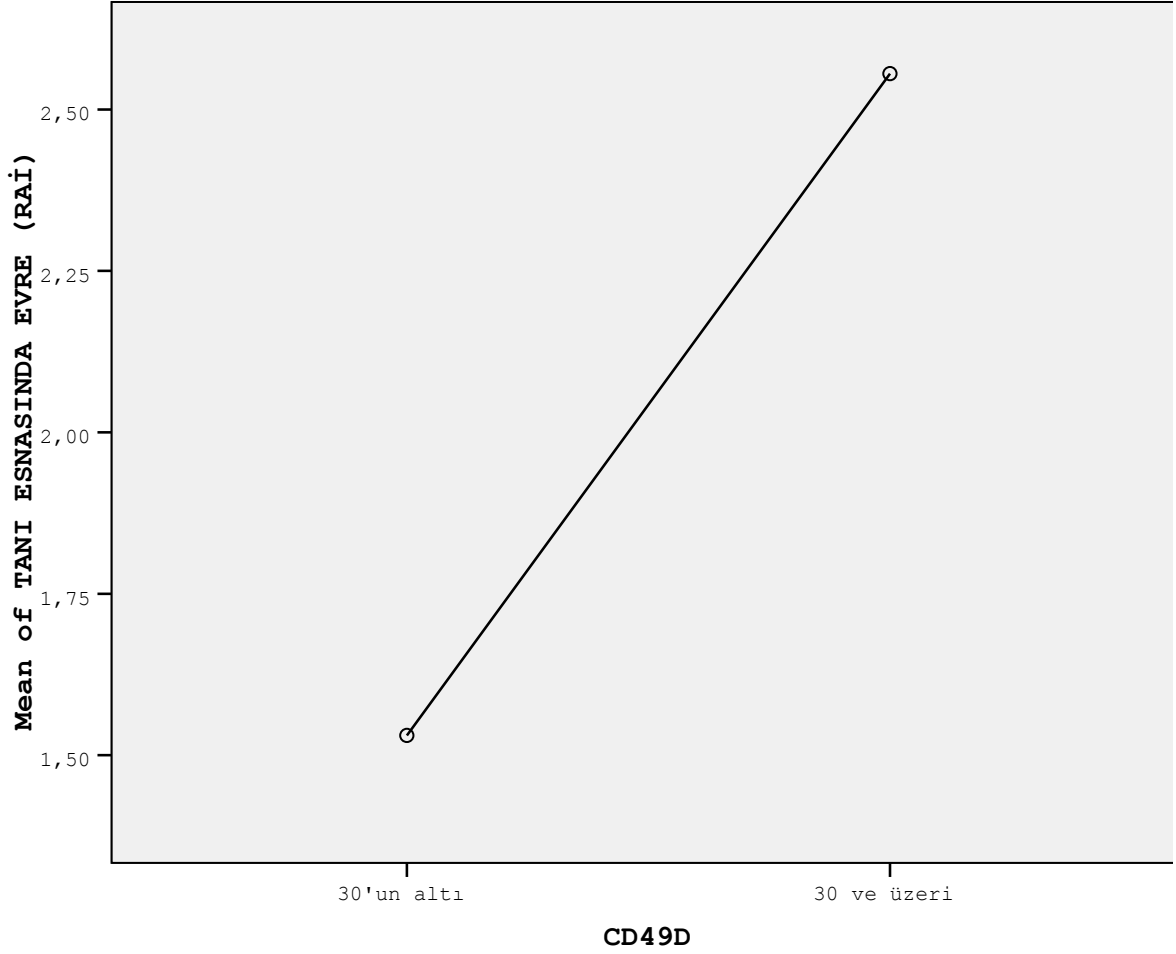
CD49d ekspresyonu, 58 hastada bakılabilmıştır. Prognoz üzerinde olumsuz etkisi olduğu bilinen bu belirteçin, yapılan araştırmalara göre ileri evre hastalarda daha fazla eksprese edildiği ve toplam sağ kalımı olumsuz etkileyebileceği gösterilmiştir (206,211).

CD49d ekspresyonunun evrelere göre dağılımına bakıldığında, evrenin ilerlemesi ile ortalama CD49d ekspresyonların arttığı gözlenmiştir. Evre 0 hastalarda: %4,7, evre 1 hastalarda: %3,4, evre 2 hastalarda: %12,7, evre 3 hastalarda: %11,5, evre 4 hastalarda ise %21 olarak bulunmuştur. Evreler içindeki hastaların geniş standart sapma aralıklarının bulunması ve incelemeye alınan hasta sayısının az olması nedeniyle, evreler arasında gözlenen bu fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır ($p=0,211$).

Anlamlı olmamasına karşın, ilerleyen evrelerdeki CD49d ekspresyonunun artıyor olması, Ekşioğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla paralellik göstermektedir. Yaptığımız araştırmada, CD49d'nin genel ekspresyon oranları ile, TKGZ, TS, 1 veya 2 ve 3 basamak tedavisi almış olmak arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır. CD49d'nin toplam sağ kalımı olumsuz etkilediği bilinmektedir, ancak bu etkinin belirtildiği çalışmalarda hasta takip süresi bizim takip süremizden uzundur. Hasta sayımızın az ve takip süremizin daha kısa olması nedeniyle, araştırmamızda benzer bir etki bulunamamıştır.

Zucchetto ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda, özellikle CD49d'nin yüksek oranda eksprese edildiği hastalarda, toplam sağ kalımın daha kısa olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmalarda CD49d yüksek ekspresyon sınırı %30 olarak belirlenmiştir.

Araştırmamızda CD49d>%30 olan hastalar incelendiğinde, çalışma grubunun küçük bir kısmını oluşturdukları görülmüştür (9 hasta - %15). CD49d>%30 olan hastaların evreler arasındaki dağılımında fark gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra, CD49d<%30 hastalar ile CD49d>%30 hastalar karşılaştırıldığında, yüksek ekspresyonlu hastaların ortalama evreleri daha yüksek olduğu, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil 5,1).



Şekil 5,1 CD49d<%30 ve CD49d>%30 olarak eksprese eden hastaların buldukları ortalama evre arasındaki fark (<%30 ortalama Rai 1,5, >%30 ortalama Rai 2,5, $p=0,028$). X eksenini CD49d ekspresyon oranını belirtmektedir. Y eksenini ortalama Rai evresini belirtmektedir.

Gözlediğimiz bu bulgu, daha önce de ifade edildiği gibi, evre ile CD49d ekspresyon yoğunluğu arasında pozitif yönde bir bağ olduğunu desteklemektedir.

Evre ile CD49d'nin %30'dan fazla eksprese edilmesi arasında ilişim olmasına rağmen, C49d'nin %30'dan fazla eksprese edilmesi ile TKGZ ve TS arasında anlamlı korelasyon bulunmamıştır. Bunun sebebi olarak, çalışmamızdaki hasta sayısının yetersiz olmasını gösterebiliriz.

CD49d>%30 olan ve tedavi alan hastalar incelendiğinde, 2 ve 3 basamak tedavisi alan hastaların, sadece 1 basamak tedavisi alan hastalara göre, hem ekspresyon oranlarının daha yüksek olduğu (%58 vs %46), hem de toplam sağ kalımların daha kısa olduğu (52

ay vs 64 ay) gözlenmiştir. Buna rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,075$, $p=0,089$). Yine de, CD49d'nin yüksek ekspresyonun, tedaviye kötü yanıt ve progresif hastalık ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Önemli bir prognositik belirteç olan ZAP-70 proteini, 40 hastada bakılmış olup, 26'sında pozitif bulunmuştur. ZAP-70(+) olan hastaların, risk gruplarına göre dağılımı homojendir ve yapılan çalışmalar ile uyumludur. Çalışmamızda dikkati çeken nokta hastalardaki yüksek ZAP-70 oranıdır (bakılan hastaların %65' pozitif). Bu oran, çeşitli yabancı yayınlarda en fazla %30 olarak bildirilmiştir.

ZAP-70 ekspresyonun, yaşa, cinsiyete ve lenfosit sayısına göre değişmediği saptanmıştır. Toplam sağ kalım üzerinde de etkisi bulunamamıştır, ancak bunun sebebi, güvenilir sağ kalım analizinin yapılamamış olmasıdır.

Tedaviye kadar geçen zaman açısından bakıldığında, şaşırtıcı olarak ZAP-70(+) hastalarda bu sürenin belirgin olarak daha uzun olduğu görülmüştür (mediyan 10 ay vs 1 ay). Bu bulgu, literatür ile tamamen çelişmektedir. ZAP-70(+) hastalarda, tedaviye kadar geçen sürenin anlamlı olarak daha kısa olduğu, birçok çalışmada gösterilmiştir.

Araştırmamızdaki bu fark, ZAP-70(+) hastalarının karşılaştırıldığı, tedavi alan ZAP-70(-) hasta grubunun özelliklerinden kaynaklanmaktadır.

ZAP-70 bakılan 40 hastadan 19'u tedavi almıştır (%32). Bunlardan 13'ü (%68) ZAP-70(+), 6'sı (%32) da ZAP-70(-) tir. ZAP-70(-) gruptaki hastaların tamamı orta ve yüksek risk grubunda yer alırken (4 hasta Rai evre 4), ZAP-70(+) gruptaki hastaların %67'si orta ve yüksek risk grubunda yer almaktadır. Dikkati çeken diğer bir bulgu da, ZAP-70(-) olan ve tedavi alan hastalardaki yüksek lenfosit değerleridir. 6 hastanın yarısında değerler $150000/\text{mm}^3$ 'nin üzerindedir. Aynı zamanda tedavi alan 6 hastadan 5'i nin ilk kemoterapiye kötü yanıt verdiği ve ikinci basamak kemoterapi aldığı görülmüştür. ZAP-70(+) ve tedavi alan 13 hastadan sadece 2'si ikinci basamak tedavi almıştır.

Buradan çıkan sonuç, ZAP-70(-) olan ve tedavi alan hastaların, aslında, tümör yükü fazla olan, ileri evre ve acil tedavi gereksinimi duyan hastalar olduğudur. Bu nedenle, bu gruptaki hastaların tedaviye kadar geçen zamanı kısa olarak saptanmıştır.

Yukarıdaki bilgiler ışığında, ZAP-70 ekspresyonun, tedaviye geçen zamanı uzattığı söylemek yanlış olur. Daha doğru saptama yapmak için, ZAP-70(+) ve ZAP-70(-) hastaları, uygun şekilde randomize ettikten sonra, istatistiksel analizin yapılması gerekmektedir.

Çıkan sonuçlar içinde, ZAP-70 ekspresyonun, tedavi gereksinimini arttırabileceği düşündürülen bulgular da vardır. ZAP-70 açısından değerlendirilen hastalardan 19'u tedavi almıştır. Tedavi alan 19 hastanın 13'ü ZAP-70(+)’tir (%68), diğer yandan da tedavi almayan 21 hastadan 10'u ZAP-70(+)’tir (%47). Bu bulgular, ZAP-70 ekspresyonun, hastalığın progresyonu ile ilişkili olabileceği göstermektedir. Bu korelasyonu göstermek için, daha çok hasta ve daha uzun takip süresi ile yapılan prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

CD49d ve ZAP-70 ekspresyonun, tedaviye kadar geçen zaman üzerindeki etkileri, tek değişkenli analizler ile gösterilmiştir. Çok değişkenli analiz modellerine alındıklarında ise, ikisinin de tek başlarına tedaviye kadar geçen zamanın bağımsız bir öngörücüsü olmadıkları görüldü (ZAP-70 *hazard ratio*: 0.333 %95 CI (0.088-1.263), $p=0.106$, CD49d *hazard ratio*:1.175, CI (0.213-6.467), $p=0.853$).

Daha önce de bahsedildiği gibi, çalışmamızda güvenilir sağ kalım analizi yapmak mümkün olmamıştır. Bu nedenle, tedaviye kadar geçen süre üzerinde yoğunlaştırılmıştır.

CD49d ve ZAP-70 dışında, tedaviye kadar geçen süre üzerinde etkisi olan bir prognostik parametre bulunamamıştır. Yaş, cinsiyet, lenfosit sayısı ve CD38 ile yapılan tek değişkenli analizler sonucunda böyle bir korelasyon saptanamamıştır.

CD38, iyi bilinen bir prognostik belirteçtir. Çalışmamızda, 42 hastada bakılmıştır ve bunlardan 23'ünde pozitif saptanmıştır (%54). Bu oran, daha önce yapılan çalışmalara göre daha yüksektir. Buna rağmen, CD38 ekspresyonun, sağ kalım, tedaviye kadar geçen zaman ve tedaviye yanıt üzerinde bir etkisi bulunamamıştır. Bakılan 42 hastadan 22'si tedavi almıştır. Tedavi alan hastaların 13'ü CD38(+) (%59), 9'u CD38(-)'tir (%41). Her iki grupta da ikinci basamak tedavisi alan hasta sayısı benzerdir (5 vs 6).

Yapılan çalışmalarda CD38(+) hastaların sağ kalımı daha kısa olduğu gösterilmiştir (191). Ancak bu etki, tanıdan sonraki 40–50 aylarda ortaya çıkmaktadır. Benzer etkinin çalışmamızda görünmemesinin sebebi, kısa takip süresi olabilir.

KLL'de hastalık evresi, en önemli prognostik belirteçtir. Çalışmamızda, hastalık evresi ve risk gruplarına göre, sağ kalım ve tedaviye kadar geçen zaman değerlendirildiğinde, genel bilgiler ile uyumlu olarak, evrenin ilerlemesi ile tedaviye kadar geçen zamanın kısaldığı ve sağ kalım oranlarının düştüğü gösterilmiştir.

Kanıtlanmış immünolofenotipik prognostik belirteçlerin dışında, tanıda kullanılan hücre yüzey belirteçlerinin de dağılım özellikleri ve prognostik değerleri araştırılmıştır.

Evrelere göre dağılımına baktığımızda, CD23+43, kappa ve lambda yüzey hafif zincir, dağılımların evreler arasında homojen olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak anlamlı

olmasa da, lambda hafif zincir ekspresyonu evre 1 hastalarda daha yoğun olduğu görülmektedir. Araştırmamıza katılan hastaların küçük bir bölümü (%12) lambda eksprese etmesi ve hasta sayısının az olması nedeniyle bu bulgunun rastlantısal olduğuna inanmaktayız.

Evreler arasındaki CD5+19 ekspresyonun dağılımına baktığımızda, evre ile birlikte ekspresyon oranlarının da arttığını gözlemledik (evre 0: %54, evre 1: %59, evre 2: %67, evre 3: %30, evre 4: %75). Hastalığın ilerlemesi ile tümör yükünün artması dolayısı ile CD5+19 ekspresyonun da artmış olması şaşırtıcı değildir. Bu noktada ilginç olarak evre 3 hastalarda CD5+19 ekspresyonu evre 2 ve evre 4 göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Evre 3 hastaların ortalama ekspresyon oranının yüksek standart sapması olmasına rağmen bu istatistiksel anlamlılığın saptanması şaşırtıcıdır. Daha önce de bahsedildiği gibi, ileri evre, özellikle de evre 3 hastaların tanımlanmasında güçlükler yaşanmaktadır. Çalışmamızdaki evre 3 hastaların CD5+19 ekspresyonları beklenenden düşük olması, gerçekte, bu hastaların bir kısmı, daha düşük evrede olabileceği sorusunu akla getirmektedir.

Tanısal immünofenotipik belirteçlerin, tedaviye kadar geçen zaman üzerindeki etkileri araştırıldığında, herhangi bir korelasyon kurulamamıştır. CD5+19 ekspresyonunun ileri evre hastalarda daha yüksek olması ve bu evrelerdeki hastaların tedaviye daha erken başlamaları, CD5+19 ile TKGZ arasında kurulabilecek tek ilişkidir.

Tanısal belirteçlerin, toplam sağ kalım analizlerinde, lambda hafif zincir ekspresyonu, sağ kalım ile pozitif yönde ilişkili bulunmuştur ($p=0,023$). Tanımlanan bu korelasyon %30 ekspresyon düzeyinden itibaren anlamlılık kazanmaktadır. Bildiğimiz kadarı ile şu ana dek lambda hafif zincir ekspresyonunun, bu şekilde, toplam sağ kalım üzerinde olumlu etkisi tanımlanmamıştır. Çalışmada yer alan lambda(+) hastaların az olması (6 hasta) ve bu hastaların çoğu düşük risk grubunda yer alması (4 hasta) bu etkiyi açıklamaktadır.

Diğer tanısal belirteçlerin toplam sağ kalım üzerinde etkileri bulunmamıştır.

Sadece 1 basamak tedavisi alan hastalar ile 2 ve 3 basamak tedavileri alan hastalardaki, tanısal belirteçlerin dağılımına baktığımızda anlamlı korelasyon saptanmamıştır. Bu noktada CD23+43 ekspresyon oranlarında anlamlı, olmasa da, bir fark bulunmuştur. Sadece 1 basamak tedavisi alan hastalarda CD23+43 koekspresyonunun ortalaması %45 iken, 2 ve 3 basamak tedavisi alan hastalarda %36 olarak bulunmuştur ($p=0,292$). CD23 eksprese etmeyen KLL hastaların prognozu daha kötü olduğu bilinmektedir. Araştırmamızda yer alan tedaviye dirençli vakalardaki CD23 ekspresyonunun daha düşük

olması, bu gerçeğin yansıması olabilir. Ancak bu etkinin gösterilebilmesi için geniş popülasyonlu ve uzun takip süreli çalışmanın yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızın önemli eksiklerinden biri, tedavi ve tedaviye yanıt ile ilgili istatistiksel analizlerin yapılamamasıdır. Tedavi protokolleri ile ilgili verilerin genel olarak tam olmasına karşın, tedaviye yanıt ve tedavi sonrası remisyon süreleri ile ilgili verilerin dağılımı bozuktur.

Diğer önemli eksik de, sitogenetik verilerin azlığıdır. Çalışmamızda değerlendirilen hastaların sadece 16'da sitogenetik araştırma yapılmıştır. Bu hastalardan sadece 6'sı FISH yöntemi ile araştırılmıştır. Konvansiyonel sitogenetik ile araştırılan 10 hastadan 3'de tek başına del 13q saptanmıştır, 1 hastada trizomi 5, diğerlerinde ise normal sitogenetik yapı gösterilmiştir. FISH yöntemi ile incelenen 6 hastadan, 1'inde del 17p, 1'inde del 13q, 2'sinde tek başına del 13q, 2'sinde de normal bulunmuştur.

Sitogenetik inceleme yapılan hastaların sayısı çok az olması ve heterojen dağılmış olması nedeniyle, bu hastalar üzerinde istatistiksel analiz yapılamamıştır. Sitogenetik parametrelerin böyle bir çalışmaya eklenmesi, prognostik öngörü gücünü arttıracaktır. İleride yapılacak olan KLL çalışmalarında özellikle FISH yöntemi ile sitogenetik özelliklerin araştırılması, hastalığın patofizyolojisi ve seyri üzerinde aydınlatıcı bilgiler sunacağına inanmaktayız.

Çalışmamızın birçok eksik tarafı olmasına karşın, bildiğimiz kadarı ile, henüz ülkemizde KLL ile ilgili, multiparametrik prognostik araştırma yapılmamıştır.

Üzerinde çalıştığımız hastalıkları daha iyi anlamak ve hastaları risk gruplarına göre ayırıp tedavi ve takip planı oluşturmak için, hastalıklar ile ilgili prognostik belirteçlerin net olarak değerlendirilmesi gerekmektedir.

Bu ülkede çalıştığımızı göre, ülkemizdeki hastalardan elde edilmiş olan klinik veriler doğrultusunda ilerlememiz gerektiği inancındayız.

Bu nedenle, yerel klinik birimlerin, gerek tek, gerekse çok merkezli prospektif çalışmalar ile hastaların ve hastalıkların özelliklerini tanımlanması için çaba harcamaları gerekmektedir.

Sitogenetik çalışmalar, özel eğitim ve yüksek maliyet gerektiren çalışmalardır. Ancak, günümüzde sitogenetik araştırmalar, bilimin her alanında vazgeçilmez araçlardır. Bu gerçeği kabul edip, genetik araştırmaların yaygın olarak uygulanması için farkındalık oluşturulması bir gerekliliktir.

6. KAYNAKLAR

1. Cheson BD, Bermet JM, Grever M, et al. National Cancer Institute-sponsored working group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996;87:4990–4997.
2. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *New Engl J Med* 1995;333:1052–1057.
3. Caligaris-Cappio F, Hamblin TL. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol* 1999;17:399–408.
4. Caligaris-Cappio F. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a malignancy of antiself B cells. *Blood* 1996;87:2615–2620.
5. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001;194:1625–1638.
6. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001;194:1639–1646.
7. Diehl LF, Kamell LH, Menek HR. The National Cancer Data Base report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1999;86:2684–2692.
8. Sgambali MT, Linet MS, Devesa SS. Chronic lymphocytic leukemia: epidemiological, familial, and genetic aspects. In: Cheson BD, ed. *Chronic lymphoid leukemias*, 2nd ed. New York: Mareel Dekker Inc, 2001,33–62.
9. Zent CS, Kyasa MJ, Evans R, et al. Chronic lymphocytic leukemia incidence is substantially higher than estimated from tumor registry data. *Cancer* 2001;92:1325–1330.
10. Houlston RS, Catovsky D, Yuille MR. Genetic susceptibility to chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002;16:1008–1014.
11. Ishibe N, Sgambati MT, Fontaine L, et al. Clinical characteristics of familial BCLL in the National Cancer Institute Familial Registry. *Leuk Lymphoma* 2001;42:99–108.
12. Capalbo S, Trerotoli P, Ciancio A, et al. Increased risk of lymphoproliferative disorders in relatives of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia:

- relevance of the degree of familial linkage. *Eur J Haematol* 2000;65:114–117.
13. Rawstron AC, Yuille MR, Fuller J, et al. Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood* 2002;100:2289–2290.
 14. Wiernik PH, Ashwin M, Hu XP, et al. Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001;113:407–414.
 15. Horwitz M, Goode EL, Jarvik GP. Anticipation in familial leukemia. *Am J Hum Genet* 1996;59:990–998.
 16. Yuille MR, Houlston RS, Catovsky D. Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 1998;12:1696–1698.
 17. Goldin LR, Sgambali M, Marli GE, et al. Anticipation in familial chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hum Genet* 1999;65:265–269.
 18. Bevan S, Catovsky D, Matutes E, et al. Linkage analysis for major histocompatibility complex-related genetic susceptibility in familial chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000;96:3982–3984.
 19. Pritsch O, Troussard X, Magnac C, et al. VB gene usage by family members affected with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999;107:616–624.
 20. Sakai A, Marti GE, Caporaso N, et al. Analysis of expressed immunoglobulin heavy chain genes in familial B-CLL. *Blood* 2000;95: 1413- 1419.
 21. Pettitt AR, Sherrington PD, Stewart G, et al. P53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation. *Blood* 2001;98:814–822.
 22. Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, et al. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:748–753.
 23. Bullrich F, Rasio D, Kitada S, et al. ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 1999;59:24–27.
 24. Stankovic T, Stewart GS, Fegan C, et al. Ataxia telangiectasia mutated-deficient B-cell chronic lymphocytic leukemia occurs in pregerminal center cells and results in defective damage response and unrepaired chromosome damage. *Blood* 2002;99:300–309.
 25. Yuille MR, Condie A, Hudson CD, et al. ATM mutations are rare in familial chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:603–609.
 26. Dighiero G, Kipps HW, Schroeder N, et al. What is the CLL B-lymphocyte?

Leuk Lymphoma 1996;22:13–39.

27. Schena M, Larsson LG, Gottareti D, et al. Growth- and differentiation-associated expression of bcl-2 in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1992;79:2981–2989.
28. Brezinschek HP, Foster SJ, Brezinschek Dömer R, et al. Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5+/IgM+ and CD5-/IgM+ B cells. *J Clin Invest* 1997;99:2488–2501. .
29. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SI, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002;100:1177–1184.
30. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840–1847.
31. Kröber A, Seiler T, Bermer A, et al. VH mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:1410–1416.
32. Küppers R, Klein U, Hansmarm ML, et al. Cellular origin of human B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1999;341:1520–1529.
33. Van Oers MHJ, Pals ST, Evers LM, et al. Expression and release of CD27 in human B-cell malignancies. *Blood* 1993;82:3430–3436.
34. Ranheim EA, Aversa G, Cocks BG, et al. Expression of CD27 and its ligand CD70, on chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 1995;85:3556–3565.
35. Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, et al. CD27: a memory B-cell marker. *Immunol Today* 2000;21:204–206.
36. Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) cells. *J Exp Med* 1998;188:1679–1689.
37. Tangye SG, Leui YJ, Aversa G, et al. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J Exp Med* 1998;188:1691–1703.
38. Galton DAG. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Can Med*

Assoc J 1966;94,1005–1010.

39. Dameshek W. Chronic lymphocytic leukemia-an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood* 1967;29:566–584.
40. Hentgartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770–776.
41. Herr I, Debatin K-M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001;98,2603–2614.
42. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002;108:153–164.
43. Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U SA* 1999;96,10964–10967.
44. Jia L, Srinivasula SM, Liu F-T, et al. Apaf-1 protein deficiency confers resistance to cytochrome c-dependent apoptosis in human leukemic cells. *Blood* 2001;98:414-421.
45. Leoni L, Chao Q, Cottam H. Induction of an apoptotic program in cell-free extracts by 2-chloro-2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate and cytochrome c. *Proc Natl Acad Sci U SA* 1998;95:9567-9571.
46. Genini D, Adachi S, Chao Q, et al. Deoxyadenosine analogs induce programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia cells by damaging the DNA and by directly affecting the mitochondria. *Blood* 2000;96:3537-3543.
47. Chandra J, Mansson E, Gogvadze V, et al. Resistance of leukemic cells to 2-chlorodeoxyadenosine is due to a lack of calcium-dependent cytochrome c release. *Blood* 2002;99:655-663.
48. Olsson A, Diaz T, Aguilar-Santelises M, et al. Sensitization to TRAIL-induced apoptosis and modulation of FLICE-inhibitory protein in B chronic lymphocytic leukemia by actinomycin D. *Leukemia* 2001;15:1868-1877.
49. Luo X, Budihardjo i, Zou H, et al. Bid, a bcl 2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998;94:481-490.
50. Jones DT, Ganeshaguru K, Virchis AE, et al. Caspase & activation independent of Fas (CD95/ APO-I) signaling may mediate killing of B-chronic lymphocytic leukemia cells by cytotoxic drugs or γ radiation. *Blood* . 2001;98:2800-2807.
51. Wieder T, Essmann F, Prokop A, et al. Activation of caspase-8 in drug induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor ligand

interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood* 2002;97:1378-1387.

52. Panayiotidis P, Ganeshaguru K, Foroni L, et al. Expression and function of the FAS antigen in B chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia. *Leukemia* 1995;9:1227-1232.

53. Wang D, Freeman GJ, Levine H, et al. Role of the CD40 and CD95 (APO-1 Fas) antigens in the apoptosis of human B-cell malignancies. *Br J Haematol* 1997;97:409-417.

54. Olsson A, Diaz T, Aguilar-Santelises M, et al. Sensitization to TRAIL-induced apoptosis and modulation of FLICE-inhibitory protein in B chronic lymphocytic leukemia by actinomycin D. *Leukemia* 2001;15:1868-1877.

55. Kabore AF, Johnston JB, Kropp D, et al. The TRAIL death signaling pathway plays a role in chlorambucil- and fludarabine-induced apoptosis in primed CLL cells. *Blood* 2002;100:595a.

56. Zhao S, Asgary Z, Wang Y, et al. Functional expression of TRAIL by lymphoid and myeloid tumour cells. *Br J Haematol* 1999;106:827-832.

57. Friesen C, Herr I, Krammer PH, et al. Involvement of the CD95 (APO-1 FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med* 1996;2:574--577.

58. Fulda S, Strauss G, Meyer E, et al. Functional CD95 ligand and CD95 death inducing signaling complex in activation-induced cell death and doxorubicin-induced apoptosis in leukemic T cells. *Blood* 2000;95:301-308.

59. Gibson SB, Oyer R, Spalding AC, et al. Increased expression of death receptors 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and TRAIL. *Mol Cell Biol* 2000;20:205-212.

60. Wen L, Ramadevi N, Nguyen D, et al. Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2 induced apoptosis of human leukemia cells. *Blood* 2000;96:3900-3906.

61. Hanada M, Delia D, Aiello A, et al. Bcl-2 gene hypomethylation and high level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993;82:1820-1828.

62 Robertson LE, Plunkett W, McCormell K, et al. Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia* 1996;10:456-459.

63. Johnston JB, Daeninek P, Verburg L, et al. p53, mdm-2, bax and bcl-2 induce

- drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1997;26:435-449.
64. Christodouloupoulos G, Fotouru N, Krajewski S, et al. Relationship between nitrogen mustard drug resistance in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) and protein expression of Bcl-2, Bax, Bel-X and p53. *Cancer* 1997;121:59-67.
65. Kitada S, Anderson L, Akar S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with in vitro and in vivo chemo responses. *Blood* 1998;91:3379-3389.
66. Pepper C, Thomas A, Hoy T, et al. Antisense-mediated suppression of bcl-2 highlights its pivotal role in failed apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999;107:611-615.
67. Bellosillo B, Villamor N, Colomer D, et al. In vitro evaluation of fludarabine in combination with cyclophosphamide and/or mitoxantrone in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:2836-2843.
68. Stroka D, Badrichani A, Baeh F, et al. Overexpression of A1, an NF-K-inducible, anti-apoptotic BCL gene inhibits endothelial cell activation. *Blood* 1999;93:3803-3810.
69. Cheng G, Lee H, Dadgostar H, et al. NF-KB-mediated up-regulation of bcl-x and bfl-1/al is required for cd40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:9136-9141.
70. Furman RR, Asgary Z, Masearebhas JO, et al. Modulation of NF-KB activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol* 2000;164:2200-2206.
71. Chandra L, Niemer I, Gilbreath L, et al. Proteasome inhibitors induce apoptosis in glucocorticoid-resistant chronic lymphocytic leukemia lymphocytes. *Blood* 1998;92:4220-4229.
72. Alinond JB, Snowden RT, Hunter A, et al. Proteasome inhibitor-induced apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells involves cytochrome c release and caspase activation, accompanied by formation of an approximately 700 kDa Apaf-1 containing apoptosome complex. *Leukemia* 2001;15:1388-1397.
73. Adams J. Development of the proteasome inhibitor P5-341. *Oncologist* 2002;7:9-16.

74. Datta S, Brunet A, Greenberg M. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999;13:2905-2927.
75. Wiekremasinghe RG, Ganeshaguru K, Jones DT, et al. Autologous plasma activates Akt/protein kinase B and enhances basal survival and resistance to DNA damage-induced apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 2001;114:608-615.
76. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307-310.
77. Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 1994;78:539-542.
78. Cordone I, Masi S, Mauro FR, et al. p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood* 1998;91:4342-4349.
79. Döhner H, Stilgenbauer S, Bermer A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910-1916.
80. Watanabe T, Hotta T, Ichikawa A, et al. The MDM2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low-grade lymphoma of B-cell origin. *Blood* 1994;84:3158-3165.
81. Stankovic T, Stewart GS, Fegan C, et al. Ataxia telangiectasia mutated-deficient B-cell chronic lymphocytic leukemia occurs in pregerminal center cells and results in defective damage response and unrepaired chromosome damage. *Blood* 2002;99:300-309.
82. Starostik P, Manshoury T, O'Brien S, et al. Deficiency of the ATM protein expression defines an aggressive sub-group of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 1998;58:4552-4557.
83. Lin K, Sherrington PO, Dennis M, et al. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgVH mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:1404-1409.
84. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994;79:551-555.
85. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999;13:1501-1512.
86. Delmer A, Alchenbaum-Cymbalista F, Tang R, et al. Overexpression of cyclin D2 in chronic B-cell malignancies. *Blood* 1995;85:2870-2876.
87. Suzuki R, Kuroda H, Komatsu H, et al. Selective usage of D-type cyclins in

- lymphoid malignancies. *Leukemia* 1999;13:1335-1342 .
88. Wolowiec D, Ciszak L, Kosmaczcwska A, et al. Cell cycle regulatory proteins and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2001;86:1296-1304.
89. Korz C, Pscherer A, Benner A, et al. Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes. *Blood* 2002;99:4554--4561.
90. Kornblau S, Chen N, Del Ciglio A, et al. Retinoblastoma protein expression is frequently altered in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 1994;54:242-246.
91. Vrhovac R, Delmer A, Tang R, et al. Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27KIP1 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1998;91:4694-4700.
92. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, et al. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and VH gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* 2002;16:993-1007.
93. Novak U, Oppliger Leibundgut E, Hager J, et al. A high-resolution allelotype of B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 2002;100:1787-1794 .
94. Juliusson C, Merup, M. Cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 1998;25:192-196.
95. J. Oscier OC, Stevens J, Hamblin TL et al. Correlation of chromosome abnormalities with laboratory features and clinical course in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1990;76:352-358.
96. Peterson LC, Lindquist LL, Church S, et al. Frequent clonal abnormalities of chromosome band 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia: multiple clones, subclones, and nonclonal alterations in 82 midwestern patients. *Cancer Chromosomes Cancer* 1992;4:273-280.
97. Han T, Henderson ES, Emrich LJ, et al. Prognostic significance of karyotypic abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia: an update. *Semin Hematol* 1987;24:257-263 .
98. Juliusson C, Oscier OC, Fitchett M, et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosome abnormalities. *N Engl J Med* 1991;323:720-724.
99. Juliusson C, Oscier D, Cahrton C, et al. Cytogenetic findings and survival in

- B-cell chronic lymphocytic leukemia. Second IWCCLL compilation of data on 662 patients. *Leuk Lymphoma* 1991;5:21-25.
100. Garcia-Marco JA, Price CM, Catovsky D. Interphase cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;94:52-58.
101. Geisler C, Philip P, Hansen M. B-cell chronic lymphocytic leukemia: clonal chromosome abnormalities and prognosis in 89 cases. *Eur J Haematol* 1989;43:397-403.
102. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco L et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol* 1996;92:382-388.
103. J. Criel A, Michaux L, de Wolf-Petersen. The concept of typical and atypical chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1999;33:33-45.
104. Neilson JR, Auer R, White D, et al. Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia* 1997;11:1929-1932.
105. Que T, Marco J, Ellis J, et al. Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia detected by fluorescein in situ hybridization: analysis by stage, immunophenotype, and morphology. *Blood* 1993;82:571-575.
106. Weisenburger DO, Armitage JO. Mantle cell lymphoma-an entity comes of age. *Blood* 1996;87:4483--4494.
107. Kay NE, Ranheim EA, Peterson L et al. Tumor suppressor genes and clonal evolution in B-CLL. *Leuk Lymphoma* 1995;18:41--49.
108. Oscier D, Fitchett M, Herbert T, et al. Karyotypic evolution in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1991;3:16-20.
109. Fegan C, Robinson H, Thompson P, et al. Karyotypic evolution in CLL. Identification of a new sub-group of patients with deletions of 11q and advanced or progressive disease. *Leukemia* 1995;9:2003-2008.
110. Finn WC, Kay NE, Kroft SH, et al. Secondary abnormalities of chromosome 6q in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a sequential study of karyotypic instability in 51 patients. *Am J Hematol* 1998;59:223-229.
111. Hjalmar V, Kimby E, Matutes E, et al. Atypical lymphocytes in B-cell chronic lymphocytic leukemia and trisomy 12 studied by conventional staining combined with fluorescence in situ hybridization. *Leuk Lymphoma* 2000;37:571-576.
112. Garcia-Marco JA, Price CM, Catovsky D. Interphase cytogenetics in chronic

- lymphocytic leukemia. *Cancer Genetic Cytogenet* 1997;94:52-58.
113. Auer RL, Bienz N, Neilson J. The sequential analysis of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999;104:742-744.
114. Lens D, Dyer MJ, Garcia-Marco JM, et al. p53 abnormalities in CLL are associated with excess of prolymphocytes and poor prognosis. *Br J Haematol* 1997;99:848-857.
115. Yong-Ming Z, Haynes AP, Keith FJ, et al. Abnormalities of retinoblastoma gene expression in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* 1995;18:61--67.
116. Stilgenbauer S, Döhner H, Bulgay-Morsehel M, et al. High frequency of monoallelic retinoblastoma gene deletion in B-cell chronic lymphoid leukemia shown by interphase cytogenetics. *Blood* 1993;81:2118-2124.
117. Hawthorn LA, Chapman R, Oscier D, et al. The consistent 13q14 translocation breakpoint seen in chronic B-cell leukaemia (BCLL) involves deletion of the D13S2510 locus which lies distal to the retinoblastoma predisposition gene. *Oncogene* 1993;8:1415-1419.
118. Liu Y, Szekely L, Grandt D, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells with allelic deletions at 13q14 commonly have one intact RB-1 gene: evidence for a role of an adjacent locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8697-8701.
119. Mertens D, Wolf S, Schroeter P, et al. Down-regulation of candidate tumor suppressor genes within chromosome band 13q14.3 is independent of the DNA methylation pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99:4116-4121.
120. Migliazza A, Boseh F, Komatsu H, et al. Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in Bcell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;97:2098-2104.
121. Bullrich F, Fujii H, Calin G, et al. Characterization of the 13q14 tumor suppressor locus in CLL: identification of ALT1, an alternative splice variant of the LEU2 gene. *Cancer Res* 2001;61:6640-6648.
122. Panayiotidis P, Ganeshaguru K, Rowntree C, et al. Lack of clonal BRCA2 gene deletion on chromosome 13 in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1997;97:844-847.
123. Monni O, Knuutila S. 11q deletions in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* 2001;40:259-266.

124. Sembries S, Pahl H, Stilgenbauer S, et al. Reduced expression of adhesion molecules and cell signaling receptors by chronic lymphocytic leukemia cells with 11q deletion. *Blood* 1999;93:624--631.
125. Aalto Y, EL-Rita W, Vilpo L, et al. Distinct gene expression profiling in chronic lymphocytic leukemia with 11q23 deletion. *Leukemia* 2001;15:1721-1728.
126. Au WY, Horsman DE, O'Hara H, et al. Bcl-3/IgH translocation (14;19)(q32;q13) in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2002;43:813-816.
127. Ghia P, Caligaris-Cappio F. The indispensable role of microenvironment in the natural history of low grade B cell neoplasms. *Adv Cancer Res* 2000;79:157-174.
128. Orsini E, Guarini A, Foa R. Accessory cells, cytokine loops and cell-to-cell interactions in chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2000;4:73-98.
129. Cordingley PT, Bianchi A, Hoffbrand AV, et al. Tumour necrosis factor as an autocrine tumour growth factor for chronic B-cell malignancies. *Lancet* 1988;1:969-971.
130. Digel W, Stefanic M, Schoniger W, et al. Tumor necrosis factor induces proliferation of neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1989;73:1242-1246.
131. Tangye SG, Taison RL. Human cytokines suppress apoptosis of leukaemic CD5+ B cells and preserve expression of bcl-2. *Immunol Cell Biol* 1997;75:127-135.
132. Ferrajoli A, Keating MJ, Manshour T, et al. The clinical significance of tumor necrosis factor- α plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:1215-1219.
133. Michalevicz R, Porat R, Vearopoulos M, et al. Restoration of in vitro hematopoiesis in chronic lymphocytic leukemia by antibodies to tumor necrosis factor. *Leuk Res* 1991;15:111-120.
134. Digel W, Porzolt F, Schmid M, et al. High levels of circulating soluble receptors for tumour necrosis factor in hairy cell leukemia and type B chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 1992;89:1690-1693.
135. Kremer JP, Reisbach G, Nerl C, et al. B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells express and release transforming growth factor-beta. *Br J Haematol*

1992;80:480-487.

136. Lagneaux L, Delforge A, Dorval C, et al. Excessive production of transforming growth factor-beta by bone marrow stromal cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia inhibits growth of hematopoietic precursors and interleukin-production. *Blood* 1993;82:2379-2385.

137. Israels LG, Israels SJ, Begleiter A, et al. Role of transforming growth factor-beta in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 1993;17:83-87.

138. DeCoteau IF, Knaus PI, Yankelev H, et al. Loss of functional cell surface transforming growth factor-beta (TGF- β) type 1 receptor correlates with insensitivity to TGF- β in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5877-5881.

139. Douglas RS, Capocasale RJ, Lamb RJ, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells are resistant to the apoptotic effects of transforming growth factor-beta. *Blood* 1997;89:941-947.

140. Long BW, Witte PL, Abraham GN, et al. Apoptosis and interleukin 7 gene expression in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1416-1420.

141. Trenlin L, Cerulti A, Zambello R, et al. Interleukin-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Blood* 1996;87:3327-3335.

142. Knauf WU, Langenmayer I, Ehlers B, et al. Serum levels of soluble CD23, but not soluble CD25, predict disease progression in early stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1997;27:523-532.

143. Foa R, Fierro MT, Giovarelli M, et al. Immunoregulatory T-cell defects in B cell chronic lymphocytic leukemia: cause or consequence of the disease? The contributory role of a decreased availability of interleukin 2 (IL2). *Blood Cells* 1987;12:399-412.

144. Aguilar-Santclises M, Gigliotti D, Osorio LM, et al. Cytokine expression in B cell in relation to disease progression and in vitro activation. *Med Oncol* 1999;16:289-295.

145. Buhmann R, Nolte A, Westhaus D, et al. CD40-activated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor immunotherapy: stimulation of allogeneic versus autologous T cells generates different types of effector cells. *Blood* 1999;93:1992-2002.

146. Kilada S, Zapala IM, Andreeff M, et al. Bryoslatin and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999;106:995-1004.
147. Romano MF, Lamberti A, Tassone P, et al. Triggering of CD40 antigen inhibits fludarabine induced apoptosis in B chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1998;92:990-995.
148. Younes A, Snell V, Consoli U, et al. Elevated levels of biologically active soluble CD40 ligand in the serum of patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1998;100:135-141.
149. Cantwell M, Hua T, Pappas J, et al. Acquired CD40-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med* 1997;3:984-989.
150. Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, et al. Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99:1030--1037.
151. De Lima M, O'Brien S, Lerner S, et al. Chronic lymphocytic leukemia in the young patient. *Semin Oncol* 1998;25:107-116.
152. Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, et al. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood* 1999;94:448-454.
153. International Workshop on chronic lymphocytic leukemia. Chronic lymphocytic leukemia: recommendations for diagnosis, staging and response criteria. *Ann Intern Med* 1989;110:236-238.
154. Feliu E, Rozman C, Montserrat E, et al. Cytoplasmic inclusions in lymphocytes of chronic lymphocytic leukaemia. *Scand J Haematol* 1983;31:510-512.
155. Eseribano L, Heinrichs B, Villarrubia i, et al. Juvenile chronic lymphocytic leukemia with unusual intraecisternal inclusions: an ultrastructural study. *Leuk Lymphoma* 1995;17:515-519.
156. Bennett IM, Calovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. *J Clin Pathol* 1989;42:567-584.
157. Rozman C, Montserrat E, Rodriguez-Fernandez IM, et al. Bone marrow histologic pattern. The best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia. A multivariate analysis of 329 cases. *Blood* 1984;64:642-648.
158. Hoyer ID, Ross CW, Li C-Y, et al. True T-cell chronic lymphocytic leukemia: a morphologic and immunophenotypic study of 25 cases. *Blood* 1995;86:1163-1169.

159. Matutes E, Calovsky D. Similarities between T-cell chronic lymphocytic leukemia and the small-cell variant of T-prolymphocytic leukemia. *Blood* 1996;87:3520.
160. Geisler CH, Larsen JK, Hansen NE, et al. Prognostic importance of flow cytometric immunophenotyping of 540 consecutive patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1991;78:1795-1802.
161. Di Guiseppe JA, Borowicz MJ. Clinical utility of flow cytometry in the chronic lymphoid leukemias. *Semin Oncol* 1998;25:6-10.
162. Matutes E, Polliack A. Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2000;4:22-47.
163. Gascoyne RD. Differential diagnosis of the chronic B-cell lymphoid leukemias. In: Cheson BD, ed. *Chronic lymphoid leukemias*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker inc, 2001:209-230.
164. Damle R, Ghiotto F, Valetto A, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 2002;99:4087-4093.
165. Moreau EI, Matutes E, A'Hern RP, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol* 1997;108:378-382.
166. Zupo S, Massara R, Dono M, et al. Apoptosis or plasma cell differentiation of CD38-positive B-chronic lymphocytic leukemia cells induced by cross-linking of surface IgM or IgD. *Blood* 2000;95:1199-1206.
167. Di Raimondo F, Albilar M, Huh Y, et al. The clinical and diagnostic relevance of CD23 expression in the chronic lymphoproliferative disease. *Cancer* 2002;94:1721-1730.
168. Hubmann R, Schwarzmeier ID, Shehala M, et al. Notch2 is involved in the overexpression of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99:3742-3747.
169. Alfarano A, Indraccolo S, Circosta P, et al. An alternatively spliced form of CD79b gene may account for altered B-cell receptor expression in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;93:2327-2335.
170. Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, et al. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood* 2002;100:635-639.

171. Serke S, Schwaner I, Yordanova M, et al. Monoclonal antibody FMC7 detects a conformational epitope on the CD20 molecule: evidence from phenotyping after Rituxan therapy and transfectant cell analyses. *Cytometry* 2001;46:98104.
172. Ikematsu W, Ikematsu H, Okamura S, et al. Surface phenotype and 19 heavy chain gene usage in chronic B-cell leukemias: expression of myelomonocytic surface markers in CD5(-) chronic B-cell leukemia. *Blood* 1994;83:2602-2610.
173. Kipps T, Carson DA. Autoantibodies in chronic lymphocytic leukemia and related systemic autoimmune diseases. *Blood* 1993;81:2475-2487.
174. Huang JC, Finn WG, Goolsby CL, et al. CD5(-) small B-cell leukemias are rarely classifiable as chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 1999;111:123-130.
175. Giardina SL, Schroff RW, Kipps T, et al. The generation of monoclonal antiidiotypic antibodies to human B-cell derived leukemias and lymphomas. *J Immunol* 1985; 135:653-658.
176. Fais F, Seliars B, Ghiotto F, et al. Examples of in vivo isotype class switching in IgM+ chronic lymphocytic leukemic B cells. *J Clin Invest* 1995;98:7:1659-1666.
177. Dono M, Hashimoto S, Fais F, et al. Evidence for progenitors of chronic lymphocytic leukemia B cells that undergo intraclonal differentiation and diversification. *Blood* 1996;87:1586-1594.
178. Keating MJ, Lerner S, Kantarjian H, et al. The serum beta2-microglobulin (beta2M) level is more powerful than stage in predicting response and survival in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 1995;86:606a.
179. Rai JL, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46:219-234.
180. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48:198-206.
181. Thomas R, Ribeiro I, Sheperd P, et al. Spontaneous clinical regression in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2002;116:341-345.
182. Dighiero G, Maloum K, Desablens B, et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1998;338:1506-1514.
183. Dighiero G, Binet J-L. When and how to treat chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1799-1801.
184. Catovsky D, Fooks J, Richards S. Prognostic factors in chronic lymphocytic

- leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. *Br J Haematol* 1989;72:141-149.
185. Oscier DG, Matutes E, Coplestone A, et al. Atypical lymphocyte morphology: an adverse prognostic factor for disease progression in stage A CLL independent of trisomy 12. *Br J Haematol* 1997;98:934-939.
186. Lee JS, Dixon DO, Kantarjian HM, et al. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood* 1987;69:929-936.
187. Montserrat E, Sanchez-Bisonô J, Vinolas N, et al. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. Analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 1986;62:567-575.
188. Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1987;60:2712-2716.
189. Molica S, Levato D, Dattilo A, et al. Clinico-prognostic relevance of quantitative immunophenotyping in B-cell chronic lymphocytic leukemia with emphasis on the expression of CD20 antigen and surface immunoglobulins. *Eur J Haematol* 1998;60:47-52.
190. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, et al. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;98:2633-2639.
191. Ibrahim S, Keating M, Do K-A, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;98:181-186.
192. Chevallier P, Penther D, Avet-Loiseau H, et al. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2002;116:142-150.
193. Apostolopoulos A, Symeonidis A, Zoumbvos N. Prognostic significance of immune function parameters in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Hematol* 1990;44:39-44.
194. Rose, D.M., Han, i. & Ginsberg, M.H. (2002) Alpha 4 integrins and the immune response. *Immunological Reviews*, 186, 118-124.
195. Baldini L., Cro, L., Calori, R., Nobili, L., Silvestris, I. & Maiolo, A.T. (1992) Differential expression of very late activation antigen-3 (VLA-3)/VLA-4 in B-cell non-Hodgkin Lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 79, 2688-2693 .
196. Eksioğlu-Demiralp, E., Alpdogan, O., Aktan, M., Firatli, T., Ozturk, A.,

- Budak, T., Bayik, M. & Akoglu, T. (1996) Variable expression of CD49d antigen in B cell chronic lymphocytic leukemia is related to disease stages. *Leukemia*, 10, 1331-1339.
197. Csanaky, G., Matutes, E., Vass, J.A., Moriila, R. & Catovsky, D. (1997) Adhesion receptors on peripheral blood leukemic B cells. A comparative study on B cell chronic lymphocytic leukemia and related lymphoma/leukemias. *Leukemia*, 11, 408-415.
198. Lucio, P.J., Faria, M.T., Pinto, A.M., da Silva, M.R., Correia Junior, M.E., da Costa, R.J. & Parreira, A.B. (1998) Expression of adhesion molecules in chronic B-cell lymphoproliferative disorders. *Haematologica*, 83, 104- II 1.
199. Behr, S.1., Korinth, D. & Schriever, F. (1998) Differential adhesion pattern of B cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 12, 71-77.
200. Till, K.J., Lin, K., Zuzel, M. & Cawley, J,C (2002) The chemokine receptor CCR7 and alpha 4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood*, 99, 2977-2984.
201. de la Fuente, M.T., Casanova, B., Cantero, E., Hernandez del Cerro, M., Garcia-Marco, J., Silva, A. & Garcia-Pardo, A. (2003) Involvement of p53 in alpha4beta1 integrin-mediated resistance of B-CLL cells to fludarabine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311, 708-712.
202. Durig, J., Nuckel, H., Huttmann, A., Kruse, E., Holter, T., Halfmeyer, K., J;uhrer, A., Rudolph, R., Kalhori, N., Nusch, A, Deaglio, S., Malavasi, F., Moroy, T., Klein-Hitpass, 1. & Duhrsen, U. (2003) Expression of ribosomal and translation-associated genes is correlated with a favorable clinical course in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 101, 2748-2755.
203. Zucchetto, A., Bomben, R., Dal Bo, M., Bnlian, P., Benedetti, D., Nanni, P., Del Poeta, G., Degan, M. & Gattei, V. (2006a) CD49d in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlated expression with CD38 and prognostic relevance. *Leukemia*, 20, 523-525.
204. Mauro FR, De Rossi G, Burgio VL, et al. Prognostic value of bone marrow

- histology in chronic lymphocytic leukemia. A study of 335 untreated cases from a single institution. *Haematologica* 1994;79:334-341.
205. Frisch B, Bartl R. Histologic classification and staging of chronic lymphocytic leukemia. A retrospective and prospective study of 503 cases. *Acta Haematol* 1988;79:140-152.
206. Montserrat E, Villamor N, Reverter JC, et al. Bone marrow assessment in B cell chronic lymphocytic leukemia: aspirate or biopsy ? A comparative study in 258 patients. *Br J Haematol* 1996;93:111-116.
207. Oudat R, Keating MJ, Lerner S, et al. Significance of the levels of bone marrow lymphoid infiltrate in chronic lymphocytic leukemia patients with nodular partial remission. *Leukemia* 2002;16:632-635.
208. Molica S, Levato D, Cascavilla N, et al. Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and beta2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1999;62:117-122.
209. Hallek M, Langenmayer i, Neri C, et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;93:1732-1737.
210. Ferrajoli A, Keating MJ, Manshour T, et al. The clinical significance of tumor necrosis factor- α plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:1215-1219.