

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. TEOMAN SOYSAL

KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ TANILI HASTALARDA
VASKÜLER ENDOTEL BÜYÜME FAKTÖR (VEGF)
DÜZEYLERİNİN PROGNOZLA İLİŞKİSİ

Dr. ESRA TERZİ

UZMANLIK TEZİ

İstanbul-2006

İçindekiler

	Sayfa No
TEŞEKKÜR.....	1
KISALTMALAR.....	2
GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
GENEL BİLGİLER.....	5
GEREÇ VE YÖNTEM.....	12
BULGULAR.....	15
TARTIŞMA.....	28
ÖZET.....	33
İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY).....	34
KAYNAKLAR.....	35

Teşekkür

Asistan eğitimim süresince bana her zaman destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Işıl Bavunođlu ve Uzm. Dr. M. Cem Ar'a

Tezimi yazma sırasında bana her türlü gerekli bilgiyi ve desteği sunan tez danışmanın Prof. Dr. Teoman Soysal'a

Asistanlık eğitimime katkıda bulunan İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı'ndaki hocalarımın tümüne

Varlıklarıyla bana her zaman güç veren ve beni bugünlere getiren anneme ve rahmetli babama

Sonsuz teşekkür ederim...

Dr. Esra TERZİ

Kısaltmalar

ALL	: Akut Lenfoid Lösemi
AML	: Akut Myeloid Lösemi
B-2 M	: Beta-2 Mikroglobulin
b-FGF	: Bazik Fibroblast Büyüme Faktör
ELISA	: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
IgVH	: İmmünglobulin Ağır Zincir Gen
IWCLL	: International Workshop On Chronic Lymphocytic Leukemia
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
KML	: Kronik Myeloid Lösemi
Kİ	: Kemik İliği
NCIWG	: National Cancer Institute Working Group
LDT	: Lymphocyte doubling time; lenfosit sayısının ikiye katlanma zamanı
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
MDS	: Myelodisplastik Sendrom
MM	: Multipl Myelom
NHL	: Non Hodgkin Lenfoma
PDEGF	: Trombosit Kökenli Endotel Büyüme Faktör
PK	: Periferik Kan
RT-PCR	: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör-alfa
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor, Vasküler Endotel Büyüme Faktör
ZAP-70	: Zeta-associated Protein 70

Giriş ve Amaç

B hücreli kronik lenfositik lösemi (KLL), olgun görünümlü habis B lenfositlerin periferik kan, kemik iliği ve lenf düğümü, dalak, karaciğer gibi lenfoid komponenti olan dokularda artışı ile karakterizedir ve Batı ülkelerinde en sık görülen yetişkin lösemi türüdür (1,2).

Olguların bir kısmı takipleri süresince hiç tedavi gereksinimi göstermez ve aynı yaştaki normal hemcinsleri ile aynı yaşam sürelerine sahiptir (3). Buna karşılık bir grup olguda da tanıdan itibaren veya hastalık seyri sırasında tedavi ihtiyacı oluşur (4). Bugün için KLL’de tedavi endikasyonları ön planda hastanın evresine veya hastalığın hızlı seyrettiğine işaret eden bazı klinik özelliklerin varlığına göre belirlenmektedir (1,5).

KLL’de kullanılan güncel iki evreleme sistemi mevcuttur. Bunlar; Rai ve Binet evreleme sistemleri olarak adlandırılmaktadır (6,7). Her iki sistemde de geniş olgu grupları ele alındığında evre ile yaşam süreleri arasında anlamlı bir ilişki gösterilmiştir ve erken evrede tanısı konulan hastalar grup olarak daha uzun yaşamaktadır. Tedavinin de yaşam süresi üzerine olumlu etkisi kanıtlanmadığından erken evre KLL’de hastalık ilerlemesi gelişinceye kadar tedavi için acele edilmemektedir (8,9).

Ancak son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalarda KLL tanılı hastalarda hastalık seyrinin homojen olmadığı ve evre ile ilgili prognoz özelliğinin her hastaya aynı şekilde yansıtılamayacağı anlaşılmıştır (10). İlk tanı konulduğunda erken evrede olan ve bu nedenle tedavi verilmeyen hastaların % 40-50’sinde bir süre sonra hastalık ilerlemekte ve bunların bir kısmı hastalık nedeniyle kaybedilmektedir. Buna karşılık başlangıçta erken evrede olan olguların % 50-60’ında ise belki de yaşamları boyunca hiç tedavi gereksinimi olmamakta ve bu olguların bir kısmı KLL dışı nedenlerle kaybedilmektedirler (3,4). Bu nedenle klinik evrenin hastalık prognozunu belirlemek ve tedavi kararı vermedeki rolü sorgulanır hale gelmiştir.

Son yıllarda evre ile birlikte veya evreden bağımsız olarak anlamlılık gösteren birçok yeni prognoz parametresi tanımlanmıştır. Bugün uygulanmakta olan tedavi kriterlerine ek olarak bu yeni prognoz parametrelerinin hem hastalık seyrinin öngörülmesinde hem de tedavi endikasyonlarının değiştirilmesinde rol oynayacağı düşünülmektedir.

Evre dışında prognoz açısından anlamlı etkisi gösterilmiş parametreler arasında periferik kan (PK) lökosit ve lenfosit sayısı, kemik iliği (Kİ) tutulum şekli ve Kİ’ndeki lenfosit oranı, lenfosit sayısının ikiye katlanma zamanı (LDT), laktat dehidrogenaz (LDH), beta-2 mikroglobulin (B-2 M), timidin kinaz, sitogenetik değişiklikler, p53 ve immünglobulin ağır zincir gen (IgVH) mutasyonu, CD 38 pozitiflik oranı, ZAP-70 (zeta-associated protein)

pozitifliği sayılabilir (11,12).

Bu parametreler arasında sitogenetik, IgVH mutasyonu ve ZAP-70 pozitifliği özellikle önemli prognoz göstergeleri olarak öne çıkmalarına rağmen tetkik edilmelerindeki bazı teknik güçlükler nedeniyle güncel klinik pratikte yeterince yararlanılabilir duruma gelmemişlerdir. Bu nedenle kolayca tekrarlanabilir ve karar verdirici özelliği olan; bu nedenle yaygın kullanılabilir prognoz göstergelerinin belirlenmesinin yararı ortadadır.

Son zamanlarda KLL patogenezinde anjiogenezin rol oynadığı bildirilmiştir (13-17). Anjiogenezin oluşumunda ve aktivasyonunda vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) önemli rol oynamaktadır. KLL'de VEGF düzeyleri serumda, lösemik hücrelerde ve kemik iliğinde tetkik edilebilir. Serum VEGF düzeyi Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELİSA) yöntemiyle kolaylıkla tayin edilebilmektedir. Artmış serum VEGF düzeylerinin KLL'de hastalık progresyonu ile ilişkisine işaret eden çalışmalar vardır (15,16). Prognostik önemi gösterilebilmesi koşulu ile serum VEGF düzeyinin tayini günlük pratikte kolay uygulanabilir olması nedeniyle, prognoza etkili diğer parametreler arasında önemini belirgin olarak arttırma potansiyeli taşımaktadır.

Bu nedenle bu tez çalışmasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (CTF) İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Polikliniği'nden takip edilen KLL hastalarında serum VEGF düzeylerinin hastalık prognozu ile ilişkisinin irdelenmesini hedef aldık.

Bu amaçla KLL olgularında sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırma yapılarak serum VEGF düzeyleri tayin edildi. Hastalardaki serum VEGF düzeyleri ile hastalık prognozu arasındaki ilişki yanında daha önceden tanımlanmış diğer prognoz göstergeleri olan evre; PK lökosit ve lenfosit sayısı, hemoglobin ve trombosit düzeyleri; Kİ tutulum şekli; Kİ'nde lenfosit oranı; LDT; CD38 pozitiflik oranı; LDH ve B-2 M düzeyleri ile aralarındaki ilişki irdelenerek KLL olgularında serum VEGF düzeyinin prognoz belirlemedeki değeri incelendi.

Genel Bilgiler

1. Kronik Lenfositik Lösemi

KLL, olgun görünümlü habis B lenfositlerin periferik kan, kemik iliği ve lenf düğümü, dalak ve karaciğer gibi lenfoid dokularda artışı ile karakterize hematolojik bir kanserdir (1). Batı ülkelerinde en sık görülen yetişkin lösemi türüdür (2). Tüm kanser türlerinin % 0,8'ini, yetişkin lösemilerin % 20-30'unu oluşturur. Buna karşılık Asya ülkelerinde yetişkin lösemiler arasında sıklığı % 5'in altındadır. Batı ülkelerinde KLL tanılı hastaların % 95'inde lösemik hücreler B hücre fenotipine sahiptir (18). Hastaların büyük bir kısmı semptomsuz olduğundan gerçek sıklığını belirlemek zordur. Batı ülkelerinde görülme sıklığı 2,3/100.000 olduğu bildirilmiştir. 70 yaşın üstünde ise görülme sıklığı 50/100.000 yükselmektedir (19). Hastaların büyük bir çoğunluğunun tanı sırasında ortalama yaşı 65 olup, olguların sadece % 10-15'i 50-55 yaşın altındadır (20). Erkeklerde kadınlara göre daha sık görülmektedir.

KLL'de tanı kriterlerini tanımlayan ve yaygın olarak kullanılan iki adet rehber vardır. Bunlardan National Cancer Institute Working Group (NCIWG) tarafından hazırlanan tanı kriterleri Tablo 1'de verilmiştir (1). Internatinal Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) tarafından hazırlanan rehberdeki tanı kriterlerinde ise farklı olarak mutlak lenfosit sayısının 10.000/mm³ üzerinde olduğu kabul edilir (5).

TABLO 1 : KLL Tanı Kriterleri (NCIWG)

1. Periferik Kanda Lenfositoz : > 5.000/mm ³
2. İmmunfenotipleme : En az bir adet B hücre işareti (CD19, CD20, CD23) + CD 5
3. Kemik İliğinde Lenfositoz : ≥ % 30
4. Atipik Hücre Oranı (prolenfosit) : < % 55

Tanı için: 1 ile birlikte 2 veya 3 no'lu kriter olmalıdır. Eğer lenfosit sayısı 5.000/mm³'den az ise o zaman 2 ve 3 no'lu kriterler birlikte bulunmalıdır.

Bugün için KLL'de kullanılan güncel iki evreleme sistemi vardır. Bunlar Rai (Modifiye Rai) ve Binet evreleme sistemleridir (Tablo 2 ve 3) (6,7). Her iki evreleme sisteminde evre ile sağkalım süresi arasında anlamlı bir ilişki bulunmaktadır. Ancak her iki evreleme sisteminin iki önemli eksik tarafı vardır. Bunlardan birincisi herhangi bir evrede bulunan hastalar arasında hızlı seyir gösteren hastalar ile yavaş seyirli olabilecek hastaların başlangıçtan itibaren ayırımında yararlı değildirler. İkinci eksik tarafı da immün sitopeniler ayrı olarak

değerlendirilmezler ve immunolojik nedene bağlı anemi ve trombositopeni durumunda hastanın evresi yanlış olarak yüksek bulunur.

TABLO 2 : KLL’de Rai (Modifiye Rai) Evreleme Sistemleri

<i>EVRE</i>	<i>Klinik Özellikler</i>	<i>Medyan Sağkalım (Yıl)</i>
0	Lenfositoz (kemik iliği ve kanda)	>10
1	Evre 0 ve lenfadenopati	7
2	Evre 0 veya 1 ve splenomegali ve/veya hepatomegali	7
3	Evre 0, 1 veya 2 ve anemi (Hb <11gr/dl)	2
4	Evre 0-3 ve trombositopeni(Plt <100.000/mm ³)	2

Modifiye Rai Evreleri; Evre 0 düşük risk, Evre 1 ve 2 orta risk, Evre 3 ve 4 yüksek risk.

TABLO 3 : KLL’de BİNET Evreleme Sistemi

<i>EVRE</i>	<i>Klinik Özellikler</i>	<i>Tutulan Lenfoid Alan Sayısı</i>	<i>Medyan Sağkalım (Yıl)</i>
A	Hb≥10gr/dl; Plt≥100.000/mm ³	<3	>10
B	Hb≥10gr/dl; Plt≥100.000/mm ³	≥3	5
C	Hb<10gr/dl veya Plt<100.000/mm ³	ÖNEMSİZ	2

Binet sisteminde; iki taraflı veya tek taraflı olarak servikal, aksiller, femoral ve inguinal lenf düğümleri ile dalak, karaciğer göz önüne alınan lenfoid alanlardır.

Günümüzde KLL’de tedavi seçenekleri ön planda evreleme sistemlerine göre yapılmaktadır. KLL’de tedavi başlama endikasyonlarını standart hale getirmeye çalışan öneriler NCIWG ve IWCLL rehberinde tanımlanmıştır. Tablo 4’de NCIWG ve IWCLL tarafından tanımlanan tedavi endikasyonları verilmektedir (1,5). Bunlardan NCIWG rehberi günlük pratikte daha yaygın olarak kullanılmaktadır.

Özellikle son 30 yılda tanı alanında gelişmeler ve otomatik kan sayım makinelerin yaygınlaşması sayesinde KLL hastalarının büyük bir kısmına erken evrede tanı konulmaktadır (10). Erken evre KLL’de yapılan iki büyük çalışmada; uygulanan tek başına alkilleyici ajan veya alkilleyici ajanla birlikte kortikosteroid tedavilerinin yaşam süresi üzerine anlamlı bir etkileri olmadığı gösterilmiştir (8,9). Bu yüzden erken evre hastalarda tedavi açısından hemen karar verilmemektedir. Rai 0 veya I ya da Binet A evresinde bulunan olgulara tedaviye başlamak için hastalık progresyonu veya aktif hastalığın gösterilmesi gerekmektedir. Bununla beraber erken evre olarak takip edilen hastaların yaklaşık % 40-50’sinde bir süre sonra

hastalık ilerlemesi gelişmekte ve hastalık ilerlemesi gelişen hastaların bir kısmı hastalık nedeniyle kaybedilmektedir; bunun yanında % 50-60 hastada da hiç tedavi gereksinimi olmamaktadır (3,4). Erken dönemde tedaviden faydalanacak yaklaşık % 40-50 hasta başlangıçta sadece evreye bakılarak belirlenmemektedir. Bu hastaların tanı sırasında belirlenmesi tedavi seçeneklerinin yeniden değerlendirilmesi açısından önemlidir. Halbuki bugün için kullandığımız Rai ve Binet evreleme sistemleri bu hastaların belirlenmesinde yetersizdir. Bu nedenle hastalık evresi yanında hastalığın ilerleyici olabileceğini gösteren prognoz parametrelerine ihtiyaç duyulmaktadır.

TABLO 4 : KLL’de Tedavi Endikasyonları

A) IWCLL

<i>Evre</i>	<i>Endikasyon</i>
Binet A	Olumsuz prognoz parametreleri varlığında <ul style="list-style-type: none"> • Lenfosit sayısı $> 50 \times 10^9 /L$ • LDT < 12 ay • Diffüz kemik iliği tutulumu
Binet B ve C	Tüm olgular

B) NCIWG

<i>Protokol tedavisi için aktif hastalık dokümanite edilmelidir. Aşağıdaki kriterler aranır:</i>
1. Aşağıdaki hastalık semptomlarından en az birisinin varlığı <ul style="list-style-type: none"> • 6 ay içinde \geq % 10 kilo kaybı • Günlük ,olağan aktiviteyi engelleyecek düzeyde halsizlik (ECOG II veya daha kötü) • İki hafta veya daha fazla süren , infeksiyonla ilişkisi gösterilemeyen $100,5 \text{ }^\circ\text{F}$ üzerinde ateş • İnfeksiyonla ilişkisiz gece terlemesi
2. Anemi / trombositopeni oluşması veya derinleşmesi şeklinde ilerleyici kemik iliği yetersizliği bulgusu
3. Kosta kenarını > 6 cm geçen, masif veya ilerleyici splenomegali
4. Kortikosteroid tedaviye yanıtı iyi olmayan otoimmün hemolitik anemi ve/veya trombositopeni
5. En uzun çapı >10 cm olan masif veya gruplar oluşturan , veya ilerleyici lenfadenomegali
6. İki ay içinde % 50 artan ilerleyici lenfositoz veya tahmini LDT < 6 ay
7. Yukarıdaki kriterler mevcut değilse belirgin hipogamaglobulinemi veya monoklonal protein oluşumu protokol tedavileri için yeterli değildir.
Lenfosit sayısı tek başına tedavi sebebi olarak alınmamalı. LDT’yi içeren genel klinik tablo içinde değerlendirilmelidir.

Evre dışında, evre ile birlikte veya evreden bağımsız olarak prognoza etkili olduğu bilinen birçok parametre belirlenmiştir. Bu parametreler arasında PK lökosit ve lenfosit sayısı, Kİ tutulum şekli ve Kİ'ndeki lenfosit oranı, LDT, LDH, B-2 M, timidin kinaz, sitogenetik değişiklikler, p53 ve IgVH mutasyonu, CD 38 pozitiflik oranı, ZAP-70 pozitifliği sayılabilir (11,12). Tablo 5'de KLL'deki prognoz parametreleri belirtilmiştir. Yakın zamanda bu parametreler klinik evreye ek olarak, günlük pratikte daha kullanılır hale geleceklerdir. Çünkü KLL olgularının hastalık seyrinin öngörülmesinde ve özellikle erken evre hastalarda hastalığı ilerleyici seyir gösterebileceklerin belirlenmesinde evre tek başına yeterli olmamaktadır.

Tablo 5 : KLL'de Prognoz Faktörleri

PARAMETRE	DÜŞÜK RİSK	YÜKSEK RİSK
Cinsiyet	Kadın	Erkek
Binet Evre	A	B ve C
Rai Evre	O,I	II,III,IV
Kİ Tutulum Şekli	Non-diffuz	Diffuz
Kİ'nde Lenfosit Oranı	≤ 80 lenfosit	> % 80 lenfosit
Lenfosit Morfolojisi	Tipik	Atipik
PK Lökosit Sayısı	≤ 30-50 x 10 ⁹ / L	> 30-50 x 10 ⁹ / L
LDT	≤ 12 ay	> 12 ay
LDH / B-2 M	Normal	Artmış
Timidin kinaz ve sCD23	Normal	Artmış
Sitogenetik Değişiklikler	Normal ,ve izole del 13q	Del 11q,del 17p,trisomi 2
CD38 Pozitiflik Oranı	≤ % 7-20- 30	> % 7-20-30
IgVH Mutasyon Durumu	Mutant	non-mutant
p53 Mutasyon Durumu	non-mutant	Mutant
Zap 70	Negatif	Pozitif

Bu parametreler arasında Kİ'nde diffuz infiltrasyonun hastalık progresyonu için kötü prognoz verisi olduğu bildirilmiştir (21). Bazı çalışmalarda ise Kİ tutulum şeklinin evreye ek olarak

progresyona katkı sağlamadığı da ileri sürülmüştür (22). Aynı şekilde KLL olgularında B-2 M düzeyi ile tümör kitlesi ve hastalığın evresi arasında ilişkisi gösterilmiştir (23). Buna karşın bazı çalışmalarda B-2 M düzeyinin evreden bağımsız bir faktör olmadığını ileri sürenler de olmuştur (24). Yukarıda verilen örnekler gibi Kİ tutulum şekli ve lenfosit oranı, LDH, B-2 M, timidin kinaz gibi parametreler KLL'de kötü prognoz değeri taşıdığı belirlenmesine rağmen evreden bağımsız parametreler olarak belirlenememişlerdir.

Son zamanlarda sitogenetik değişiklikler prognoz değerlendirmesinde önem kazanmıştır. Bugün için FISH moleküler yöntemi kullanılarak % 80 oranında genomik bozukluklar tespit edilmektedir (25). Kromozom 17 p, 11q delesyon ve trizomi 12 tespit edilen hastalar; normal karyotip ve tek başına del 13 q tespit edilenlere göre daha kısa yaşam sürelerine sahip olduğu gösterilmiştir (25,26) p53 gen mutasyonunun olduğu hastalar daha kısa yaşam sürelerine sahip olup; aynı zamanda tedaviye cevap oranlarının da daha kötü olduğu bildirilmiştir (27,28).

KLL olgularının yaklaşık olarak yarısında IgVH somatik mutasyonları tespit edilmiştir (29). IgVH mutasyonu saptanmayan olguların IgVH mutasyonu saptananlara göre daha kısa sürede hastalık progresyonu geliştirdiği ve yaşam sürelerinin daha kısa olduğu bildirilmiştir (29,30). Bununla beraber, bu tür gen mutasyonlarının saptanması ileri laboratuvar teknikleri gerektirdiğinden rutin incelemeler içinde önerilmemektedir.

KLL'de lösemik hücrelerdeki ZAP-70 protein pozitifliği; IgVH mutasyon durumu ile yakın bir ilişki göstermektedir (31-33). Özellikle erken evre KLL'de ZAP-70 pozitif saptanan hastalarda tedavi ihtiyacı daha kısa sürede gerçekleştiği gösterilmiştir. Tanı sırasında ZAP-70 düzeyinin belirlenmesinin erken dönemde hastalık progresyonunun değerlendirilmesinde önemli bir parametre olduğu ileri sürülmüştür (31-33). Çok parametrelili akım sitometresi kullanılarak ZAP-70 düzeyleri ve Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) kullanılarak ZAP-70 mRNA saptanabilir (31-34). RT-PCR yönteminin sadece araştırma merkezlerinin laboratuvarında yapılabilmesi nedeniyle rutin klinik kullanımı yoktur. Aynı şekilde çok parametrelili akım sitometresi de rutin laboratuvarlarda yapılması zaman gerektiren zor bir işlemdir. Bu yüzden ZAP-70'in prognoz değeri gösterilmekle birlikte tayinindeki güçlük nedeniyle rutin kullanıma girememiştir.

KLL'de habis lenfositlerde yüksek oranda CD 38 pozitiflik oranının kötü prognoz parametresi olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (35-37). Ancak çalışmalarda CD 38 pozitiflik oranı için kabul edilen eşik değeri bakımından kesin bir karara varılamamıştır, % 7, % 20 ve % 30 gibi farklı eşik değerlerin prognoz değerinden söz edilmiştir (35-38). CD 38 pozitiflik oranı önemli bir prognoz parametresi olmakla birlikte CD 38 pozitiflik oranı

hastalığın seyrinde değişkenlik göstermektedir (39-40). Bu özellikleri CD 38 pozitiflik oranının dezavantajlarını oluşturmaktadır.

2. Anjiogenez Ve Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF)

Var olan kan damarlarından yeni kan damarı oluşumuna anjiogenez adı verilir (41). Çeşitli çalışmalarda kanser ve Von- Hippel-Lindau Hastalığı, ateroskleroz, periferik arteriyel hastalıklar, diyabetik retinopati ve diğer retinal hastalıklar gibi kanser dışı diğer hastalıklarda anjiogenezin direkt olarak rol oynadığı gösterilmiştir (42-46).

Bugün için anjiogenezde rol oynayan bir çok endojen düzenleyici molekül tespit edilmiştir. Bunlar içinde vasküler endotel büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor, VEGF); asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü (asidic and basic fibroblast growth factor, FGF), tümör nekrozis faktör-alfa (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α) ve trombosit kökenli endotel büyüme faktörü (platelet-derived endothelial cell growth factor, PDEGF) gibi moleküllerin anjiogenezini artırıcı aktiviteleri gösterilmiştir (47-48). Bu anjiogenezini artırıcı moleküller içinde hayvan modelleri ve klinik çalışmalarda en çok araştırılan VEGF ve b-FGF'dir (49).

VEGF; vasküler endotel hücreleri için etkili bir mitojendir, ancak diğer hücre tipleri için mitojenik aktivitesi yoktur (50). VEGF yeni damar oluşumu sırasında kemik iliği kökenli endotel hücre öncüllerinin mobilizasyonunda da önemli rol oynar (51). Arteriyel ve venöz sistemde yeni damar oluşumu sırasında endotel hücrelerinin apoptozun inhibisyonu ile yaşam sürelerinin artmasına, proliferasyonuna, migrasyonuna neden olarak direkt olarak anjiogenezde etkilidir. VEGF aynı zamanda kan damarlarının vazodilatasyonuna ve doku ödemeine neden olmaktadır.

Solid tümörlerde; tümörün büyümesi, invazyonu ve metastaz yapması ile VEGF düzeyleri arasında anlamlı ilişki gösterilmiştir. Çeşitli çalışmalarda meme, akciğer, kolorektal, prostat, safra kesesi ve karaciğer gibi birçok solid tümörde VEGF düzeylerinin yüksekliğinin kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (52-57).

Birçok çalışmada akut myeloid lösemi (AML), akut lenfoid lösemi (ALL), kronik lenfositik lösemi (KLL), non hodgkin lenfoma (NHL), multilpl myelom (MM), myelodisplastik sendrom (MDS) ve kronik myeloid lösemi (KML) gibi hematolojik kanserlerde de artmış anjiogenez ve bununla ilişkili olarak artmış VEGF düzeyleri tespit edilmiştir (58-63). Aguayo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada KLL, AML, KML ve MDS'de plazma VEGF düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (63).

Son zamanlarda bazı çalışmalarda KLL patogenezinde anjiogenezin rol oynadığı gösterilmiştir (13-17). Molica ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yeni tanı almış Binet A

evresindeki 45 KLL'li hastanın kemik iliğinde damar alanı genişliği kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada damar alanı genişliği daha yüksek olan hastalarda hastalık progresyonu daha kısa sürede gerçekleşmiştir (16). KLL'de lösemik hücrelerde Western blot ve RT-PCR yöntemleri ile hücre içi VEGF-mRNA ve kemik iliğinde de VEGF antikorları kullanılarak yapılan boyanma yöntemiyle VEGF düzeyleri tespit edilebilmektedir (16,64). 2000 yılında yayınlanan bir çalışmada 11 KLL hastasında; akım sitometrisi ve VEGF'nin 165 ve 121 izoformuna yönelik monoklonal antikorlar kullanılarak inceleme yapılmıştır. Tüm hastaların lösemik hücrelerinde VEGF'ye karşı pozitif reaksiyon saptanmıştır. Çalışmada dikkat çekici nokta; VEGF için ortalama florasan yoğunluğu yüksek olan hastalar düşük olan hastalara göre daha aktif hastalığa sahip oldukları gösterilmiştir (65). Ancak VEGF düzeylerinin bu şekilde tayini ileri laboratuvar teknikleri gerektirdiğinden günlük pratiğimizde kullanışlı değildir. Buna karşın serum VEGF düzeyleri ELİSA yöntemiyle kolaylıkla tayin edilmektedir. 2005 yılında yayınlanan bir çalışmada daha önce tedavi almamış farklı Rai evrelerindeki 83 KLL hastasının serum VEGF düzeyi sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p:0,01). Aynı çalışmada ileri evredeki KLL hastalarının serum VEGF düzeyleri erken evre hastalara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (p:<0,0001)(66). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda erken evre KLL'de yüksek serum VEGF düzeylerine sahip olgularda hastalık progresyonunun daha kısa sürede gerçekleştiği bildirilmiştir (15-16).

KLL'de en önemli problemlerden biri, tanı anında erken evrede olan hastaların hangilerinin ileri evreye geçebileceğini belirten prognostik bir faktörün bulunmamasıdır. Erken evre hastaların yaklaşık % 40-50'si ileri evrelere geçebilmektedir. Bu hastaların erken dönemde belirlenmesi tedavide erken davranılmasına yol açabilir.

Serum VEGF düzeyinin ELİSA yöntemiyle kolay tayin edilebilir olması nedeniyle diğer prognoz parametreleri arasında önemini belirgin olarak arttırmaktadır. Çünkü diğer parametreler arasında olan IgVH mutasyonu, sitogenetik değişiklikler , timidin kinaz , ZAP-70 tayini için ileri laboratuvar tekniklerinin kullanılması gerekmektedir. Bu yüzden bu parametreler rutin incelemeler arasında kendilerine yer bulamamaktadır. Serum VEGF düzeyi hastalık seyrini öngörmedeki etkinliğinin gösterilmesi koşulu ile kolay tetkik edilebilir olması nedeniyle ileride rutin olarak kullanılabilir.

Gereç Ve Yöntem

1. Hasta ve Kontrol Grubu

Çalışmaya Eylül 2004-Ocak 2005 tarihleri arasında İ.Ü. CTF İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Polikliniği'nce yeni tanı koyulan veya daha önce tanı konulup takip edilen KLL tanılı toplam 46 hasta dahil edildi.

Sağlıklı kontrol grubunu anjiogeneze yol açtığı bilinen hastalığı olmayan (kollajenozlar, sedef hastalığı, diyabet ve kronik karaciğer hastalığı gibi) 13 erkek, 7 kadın olmak üzere toplam 20 fakülte çalışanı ve hasta yakını oluşturdu. Kontrol grubunu oluşturan kişilerin birinde esansiyel tremor, üçünde diüretik ve kalsiyum kanal blokeri ile kontrol altına alınmış hipertansiyon mevcuttu.

Tez çalışması; çalışmaya başlamadan önce CTF yerel etik kurulu tarafından uygun bulundu. Tüm hasta ve sağlıklı kontrol grubundan kan örneği alınmadan önce çalışmaya katılmayı kabul ettiklerine dair yazılı onay alındı.

2. Çalışma Düzeni

CTF Hematoloji Polikliniği'ne düzenli kontrole gelen KLL tanılı hastalardan çalışma için yazılı onay verenler çalışmaya alındı. Anılan sürede izlenmekte olan veya yeni tanı konmuş 51 hastadan 3'ü çalışmaya katılmak istemediklerini belirttiğinden; 2 hasta da veri yetersizliği nedeniyle çalışma dışı bırakıldı. Çalışmaya toplam 46 KLL tanılı hasta dahil edildi.

Çalışmada KLL tanılı hastalarda bilinen prognoz parametreleri yanında serum VEGF düzeyleri incelendi. KLL hastalarında serum VEGF düzeyinin prognoz değerinin irdelenmesi amacıyla;

1- hastaların serum VEGF düzeyleri ile sağlıklı kontrollerin serum VEGF düzeyleri karşılaştırıldı

2- serum VEGF düzeyleri ile diğer prognoz parametreleri arasındaki ilişkiler incelendi ve

3- serum VEGF düzeyi ile hastalık progresyonu ve sağkalım arasındaki ilişki incelendi.

Hastaların KLL tanıları National Cancer Institute Working Group (NCIWG) kriterleri doğrultusunda konulmuştu (Tablo 1).

Hastaların tanı sırasındaki ve takiplerine ait fizik muayene bulguları, tanı sırasındaki tam kan sayımı, lökosit formülü, B-2 M ve LDH içeren kan biyokimyası, PK immunfenotipleme sonuçları ve Kİ bulguları dosya kayıtlarından elde edildi.

Hastaların PK lökosit ve lenfosit sayısı literatürlerde sık olarak kullanılan 50.000/mm³ ve altı ile üstü olmak üzere gruplandırılarak değerlendirildi.

Hemoglobin düzeyi literatürlerde sıklıkla kullanılan 12 gr/dl ve altı ile 12 gr/dl üstü olmak üzere ele alınarak gruplandırıldı.

Trombosit sayısı 150.000/mm³ ve altı ile üstü olmak üzere gruplandırılarak değerlendirildi.

46 hastanın 42'sinde (% 91) PK immunfenotiplemesinde CD 38 pozitiflik oranı belirlenmişti. Çalışmamızda hastalar CD 38 pozitifliğine göre % 7, % 20 ve % 30 ve altı veya üstü olmak üzere üç ayrı eşik değer ele alınarak gruplandırıldı.

Biyopsi yapılamamış veya incelemesi CTF Histopatoloji Laboratuvarı dışındaki laboratuvarlarda yapılan veya Kİ tutulum şekli tanımlanmamış olgularda Kİ biyopsi şekli istatistik değerlendirmeye alınmadı. Bu nedenle sadece 40 hastaya (% 87) ait Kİ biyopsisinin değerlendirmesi çalışma verilerinde kullanıldı. Hastalar Kİ tutulum şekli Rozman tarafından tanımlanan kritere göre diffuz ve nondiffuz oluşlarına göre gruplandırıldı.

Kİ aspirasyon verilerine göre Kİ'ndeki lenfosit yüzdesi de prognoz parametresi olarak değerlendirmeye alındı. Kİ aspirasyon değerlendirilmesi CTF Sitopatoloji Laboratuvarı'nda yapılmış 44 hastanın (% 96) verisi bu amaçla kullanıldı. Kİ'ndeki lenfosit oranı bakımından hastaların genel ortalaması olan % 70 ve literatürlerde sıklıkla kullanılan % 80 altı ve üstü olarak 2 ayrı eşik değere göre değerlendirme grupları oluşturuldu.

B-2 M (mg/L) ve LDH (U/L) düzeyleri CTF Merkez Laboratuvarında değerlendirildi. Her iki parametre laboratuvarımız üst değerinin altı ve üstü olarak gruplandırıldı. Ayrıca B-2 M çalışmamızda saptanan ortalama değer olan 3,3 mg/L ve altı ile üstü olarak gruplanarak ayrı ayrı değerlendirilmeye alındı. LDT; 12 aydan kısa ve uzun olmak üzere gruplandırılarak değerlendirildi.

Hastalar ileriye dönük olarak izlendi ve VEGF düzeyi tayininden itibaren ortalama 13 ay (11-16 ay) boyunca takip edildi. Böylece yeni tanı almış hastaların da bir süre izlenebilmeleri sağlandı. KLL'nin uzun seyirli bir hastalık olması ve çalışmamızın süresinin kısa olması nedeniyle hastalarda yaşam süresini belirleyecek kadar takip etme olanağımız yoktu. Çalışmamızda sonlanma noktası olarak hastalık progresyonuna kadar geçen süreyi kullandık. Hastalık progresyonunu ise Binet evreleme sistemine göre daha üst evreye geçme olarak tanımladık. Hastalık progresyonunu değerlendirilirken Binet C evresinde olan hastaların daha üst evreye geçme olanakları olmadığından inceleme dışı bırakıldı. Bu yüzden hastalık progresyonu Binet A ve B evresinde olan toplam 35 hastada değerlendirildi. Progresyon süresi olarak çalışma başlangıcından itibaren (VEGF düzeyi için örnek alındıktan sonra) evre ilerlemesine kadar geçen süre esas alındı. Ayrıca izleme süresi içinde kaybedilen hastalar ile

sağkalan hastalara ait prognoz parametreleri de karşılaştırıldı.

Çalışmamızda erken evre KLL tanılı hastalar ayrı bir grup olarak incelendi. Binet A evresinde olan toplam 25 hasta mevcuttu ve bu olgular erken evre KLL olarak ayrıca ele alındı. Bu hastalardan üçü çalışma başlangıcında tedavi altında olduğu için erken evre KLL olguları açısından yapılan incelemelerin dışında bırakıldı, 22 hasta bu kapsamda erken evre KLL grubu olarak değerlendirildi. Bu olgulara ait serum VEGF düzeyleri sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldı ve bu olguların progresyonları ile serum VEGF ve diğer prognoz parametreleri arasındaki ilişki ayrıca incelendi.

3. Serum VEGF Düzeyinin Tayini

Hastalar ve sağlıklı kontrol grubundan 5-6 cc periferik kan örneği alındı. Daha sonra bu kanlar serumlarına ayrıştırılıp -70°C derecede donduruldu. Tüm kanlar toplandıktan sonra CTF Merkez Biyokimya Laboratuvarında katı faz sandviç ELISA (Solide Phase Sandwich Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) yöntemi ile serumda VEGF düzeylerine bakıldı. VEGF düzeyleri The Biosource International Human VEGF Immunoassay Kit kullanılarak kantitatif olarak tayin edildi. Sonuçlar pg/ml olarak rapor edildi.

4. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

KLL hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubu arasındaki VEGF düzeyleri Mann-Whitney testi ile karşılaştırıldı. Hastalık progresyonuna kadar geçen süre Kaplan-Meier testi ile değerlendirildi ve gruplar arasındaki karşılaştırmada log-rank testi kullanıldı. Hastalık progresyonu çok yönlü analizlerde vaka sayısının yeterli olmaması nedeniyle değerlendirilemedi. Kategorik veriler karşılaştırmasında Spearman korelasyon ve ki-kare testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi. İstatistiksel işlemler için SPSS v.10 bilgisayar programı kullanıldı.

Bulgular

1. Hastalar

Çalışmamıza KLL tanısı olan toplam 45 hasta alındı. KLL hastalarının tez çalışması başlangıcındaki medyan yaşı 66 (52-81); tanı sırasındaki medyan yaşı ise 62 (48-79) olarak bulundu. Kontrol grubunun medyan yaşı ise 65 (42-74) olarak bulundu. KLL hastalarının 35'i erkek (% 76), 16'sı (% 24) kadındı. Erkek kadın oranı 2,1 olarak bulundu. Kontrol grubunun 13'ü erkek (% 65), 7'si (% 35) kadındı ve erkek kadın dağılımı 1,85 oranında saptandı.

Tanı anında 25 hasta (% 54) Binet A; 10 hasta (% 22) Binet B ve 11 hasta Binet C (% 24) evresindeydi. Rai evrelendirme sistemine göre de 9 hasta (% 20) Rai 0; 13 hasta (% 28) Rai I; 12 hasta (% 26) Rai II; 5 hasta (% 11) Rai III ; 7 hasta (% 15) Rai IV evresinde bulundu.

Serum VEGF düzeyi hastaların 6'sında (% 13) tanı anında, 40'ında (% 87) ise hastalığın seyri sırasında bakıldı. Çalışma başlangıcında 20 (% 43) hasta KLL nedeniyle tedavi altındaydı. Tedavi alan 3 hasta Binet A; 6 hasta Binet B ve 11 hasta Binet C evresindeydi.

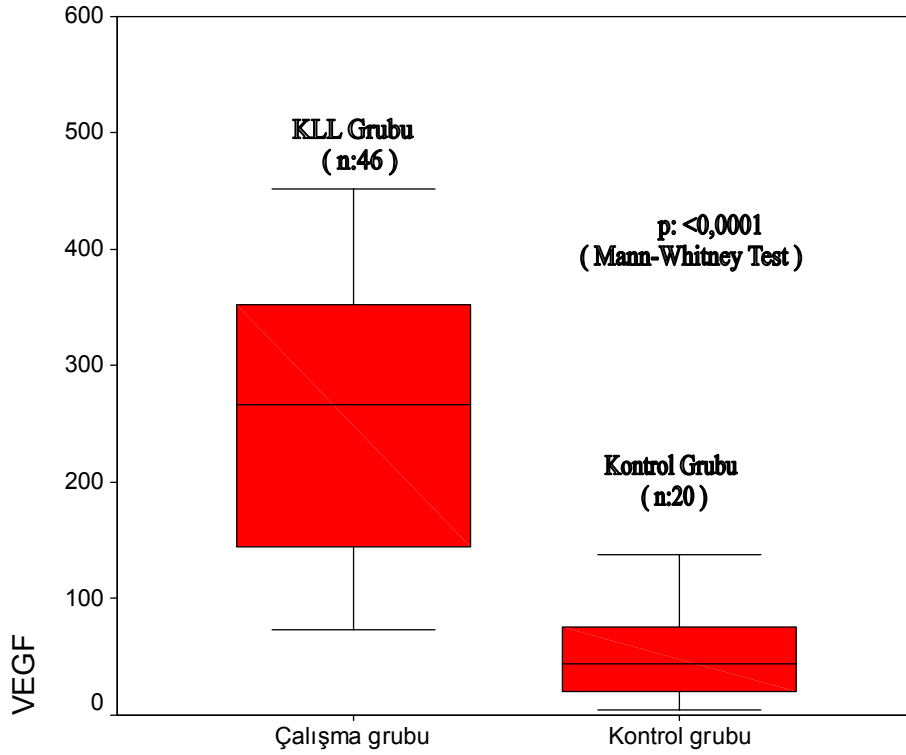
Hastaların klinik özellikleri Tablo 6'da gösterilmiştir.

TABLO 6 : KLL Tanılı Hastaların Klinik Özellikleri

	HASTA SAYISI	%
Yaş		
<65	21	46
≥65	25	54
Cinsiyet		
Kadın	15	33
Erkek	31	67
Binet Evre		
A	25	54
B	10	22
C	11	24
Rai Evre		
0	9	20
I	13	28
II	12	26
III	5	11
IV	7	15
Çalışma Başlangıcında Tedavi Alanlar	20	43

2. KLL Tanılı Hastalarda Serum VEGF düzeyleri:

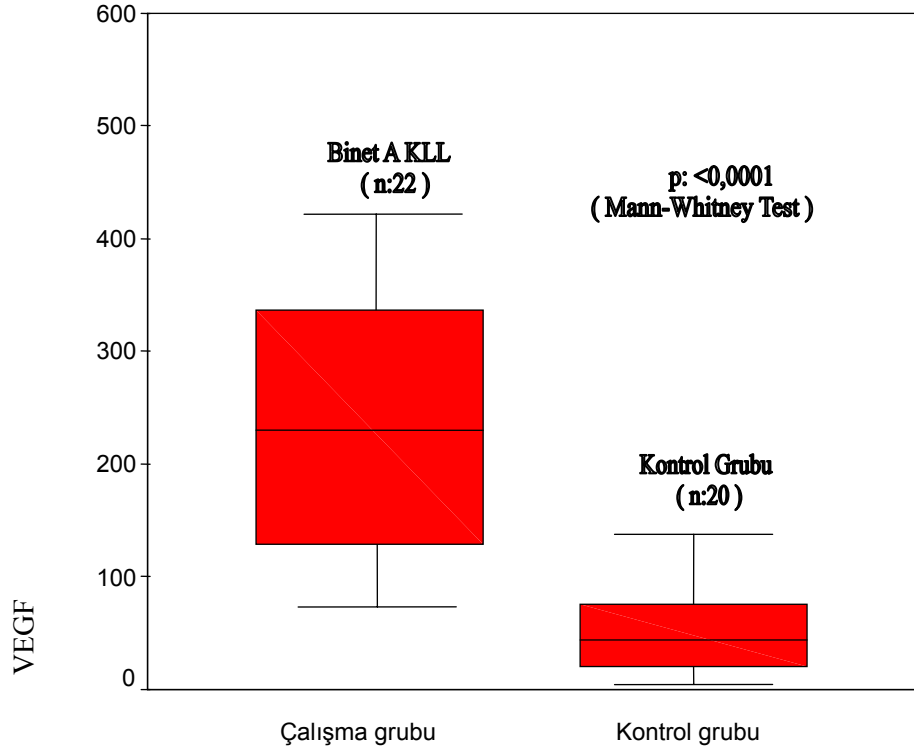
Sağlıklı kontrol grubunun medyan serum VEGF düzeyi 43,8 pg/ml (4,5-160 pg/ml), tüm KLL hasta grubunun medyan serum VEGF düzeyi 267 pg/ml (73-937 pg/ml) olarak bulundu. KLL hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında serum VEGF düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (p: <0,0001) (Şekil 1).



Şekil-1. KLL hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında medyan serum VEGF düzeylerinin karşılaştırılması (VEGF: pg/mL)

2. Erken Evre KLL Hastalarında Serum VEGF Düzeyleri

Erken evre KLL olguları (Binet A) serum VEGF düzeyleri açısından ayrıca değerlendirildi. Sağlıklı kontrol grubunun medyan VEGF düzeyi 43,8 pg/ml (4,5-160 pg/ml), erken evre KLL hasta grubunun medyan serum VEGF düzeyi 234 pg/ml (73-425 pg/ml) olarak bulundu. Bu iki grup arasındaki serum VEGF düzeyleri de birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklıydı (p:<0,0001).



Şekil-2. Erken evre KLL hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında medyan serum VEGF düzeylerinin karşılaştırılması (VEGF:pg/mL)

3. Serum VEGF düzeyleri ve KLL’de Bilinen Diğer Prognoz Parametreleri Arasındaki İlişki

KLL hastalarındaki serum VEGF düzeylerinin bilinen diğer prognoz parametreleri (yaş, cinsiyet, PK lökosit ve lenfosit sayısı, hemoglobin düzeyi, trombosit sayısı, LDT, Kİ tutulum şekli, CD 38 pozitiflik oranı, LDH ve B-2 M düzeyleri, Rai ve Binet evreleri) ile ilişkisi araştırıldı ve aşağıdaki sonuçlar bulundu.

1) Hastalar PK lökosit sayısına göre $50.000/mm^3$ ve altında olanlar ile $50.000/mm^3$ üzerinde olanlar olmak üzere iki gruba ayrıldı. Lökosit sayısı $50.000/mm^3$ üzerinde olan hastalarda serum VEGF düzeyleri anlamlı olarak yüksek saptandı (p: 0,001).

2) PK lenfosit sayısı $50.000/mm^3$ üzerinde olan hastalarda serum VEGF düzeyleri lenfosit sayısı $50.000/mm^3$ ve altında olanlara göre daha yüksekti. Lenfosit sayısı $50.000/mm^3$ ve altında olan grupta medyan serum VEGF düzeyi 236,10 pg/ml iken; lenfosit sayısı $50.000/mm^3$ üstünde olan grupta medyan serum VEGF düzeyi 351,90 pg/ml bulundu. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (p: 0,001).

3) Hastalar evre açısından iki gruba ayrılarak incelendi. Rai 0 ve I. evredeki olgular ile II, III

ve IV. evredeki olgular birbirleri ile karşılaştırılırken Binet A evresindeki olgular ile Binet B ve C evresindeki olgular serum VEGF düzeyleri açısından birbirleriyle karşılaştırıldı. Bu gruplar arasında ileri evre olarak kabul edilen hastalar yani Rai sistemine göre Rai II, III ve IV evresinde olanlar ile Binet sistemine göre B ve C evresinde olanların serum VEGF düzeyleri anlamlı olarak yüksek saptandı (sırasıyla p:0,038; p:0,027).

4) KLL tanılı hastalar Kİ tutulum şekli açısından diffuz ve nondiffuz olarak iki gruba ayrılarak incelendi. İki gruba ayrılan hastalar arasında serum VEGF düzeyleri karşılaştırıldı. Kİ'nde diffüz tutulum şekline sahip olan KLL hastalarında medyan serum VEGF düzeyleri 360,07 pg/ml iken; nondiffuz tutulum şekline sahip olanlarda ise 203,67 pg/ml olarak bulundu. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (p:0,007).

5) KLL hastaları Kİ lenfosit oranı açısından % 70,% 80 ve altı veya üstü olmak üzere iki ayrı eşik değeri ele alınarak gruplandırıldı. Kİ lenfosit oranı % 70'in üzerinde olan olgularda medyan serum VEGF düzeyi 335,28 pg/ml; % 70 ve altı olanlarda ise 210,39 pg/ml olarak bulundu. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı anlamlı bir fark saptandı (p:0,015). Kİ lenfosit oranı % 80'in üzerinde olanlarda da serum VEGF düzeyi % 80 ve altında olanlara göre daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi.

6) Serum VEGF düzeyleri ile yaş, cinsiyet, hemoglobin düzeyi, trombosit sayısı, LDT, CD 38 pozitiflik oranları (% 7, % 20 ve % 30), LDH ve B-2 M düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı. CD 38 pozitiflik oranı % 20'nin üzerinde olan olgularda serum VEGF düzeyi % 20 ve altında olanlara göre daha yüksek bulundu ancak bu ilişki anlamlı değildi (p:0,076). Ayrıca B-2 M düzeyleri 3,3 mg/L (olguların ortalaması) üzerinde olanlarda 3,3 mg/L ve altında olanlara göre daha yüksek serum VEGF düzeyleri saptandı. Ancak bu ilişki de istatistiksel olarak anlamlılık sınırını aşmadı (p:0,065).

Serum VEGF düzeyleri ile KLL'deki diğer prognoz parametreleri arasındaki bağlantılar Tablo 7'de gösterilmiştir.

TABLO 7 : Serum VEGF ile Prognoz Parametrelerinin Karşılaştırılması

Parametre	Medyan VEGF	SS	p Değeri
Yaş			
≤ 65	304,22	190,40	
> 65	245,98	127,78	0,406
Cinsiyet			
Erkek	283,10	142,61	
Kadın	270,22	214,33	0,386
PK Lökosit Sayısı			
≤ 50.000/mm ³	229,62	174,24	
> 50.000/mm ³	342,97	135,84	0,001
PK Lenfosit Sayısı			
≤ 50.000/mm ³	236,10	172,23	
> 50.000/mm ³	351,90	132,44	0,001
Hb Düzeyi			
≤ 12 gr/dl	274,14	202,13	
> 12 gr/dl	285,08	110,52	0,231
Trombosit Sayısı			
≤ 150.000/mm ³	274,62	162,91	
> 150.000/mm ³	291,01	185,05	0,812
LDT			
> 12 ay	265,63	181,47	
≤ 12 ay	328,47	163,67	0,352
Kİ tutulum şekli			
Nondiffuz	203,67	105,37	
Diffuz	360,07	191,82	0,007
Kİ Lenfosit Oranı			
≤ % 70	210,39	116,52	
> % 70	335,28	180,87	0,015

TABLO 7 : Serum VEGF ile Prognoz Parametrelerinin Karşılaştırılması (devamı)

Parametre	Medyan VEGF	SS	p Değeri
Kİ Lenfosit Oranı			
≤ % 80	264,78	170,92	
> % 80	330,48	157,74	0,119
CD 38			
≤ % 7	251,40	121,19	
> % 7	291,35	180,04	0,627
CD 38			
≤ % 20	254,47	180,11	
> % 20	328,95	147,31	0,076
CD 38			
≤ % 30	265,73	167,99	
> % 30	336,83	172,92	0,224
LDH			
≤ üst sınır	274,92	189,36	
> üst sınır	287,12	112,63	0,314
B-2 M (mg/L)			
≤ 2	276,80	255,18	
> 2	279,48	138,23	0,393
B-2 M (mg/L)			
≤ 3,3	250,19	182,48	
> 3,3	310,21	146,00	0,065
Rai			
0-I.	224,35	119,09	
II-III-IV.	328,90	190,15	0,038
Binet			
A	225,33	113,21	
B ve C	342,67	198,76	0,027

4. Binet A ve B KLL’de Hastalık Progresyonuna Etkili Faktörler

Binet A ve B evresindeki hastalarda hastalık progresyonu ile serum VEGF düzeyi ve diğer prognoz parametreleri (yaş, cinsiyet, PK lökosit ve lenfosit sayısı, hemoglobin düzeyi, trombosit sayısı, LDT, Kİ tutulum şekli, Kİ’ndeki lenfosit oranı, CD 38 pozitiflik oranı, LDH ve B-2 M düzeyleri) arasındaki ilişki incelendi. Tablo 8’de Binet A ve B KLL grubunda hastalık progresyonuna etkili faktörler gösterildi.

TABLO 8: Binet A ve B KLL’de Hastalık Progresyonuna Etkili Faktörler

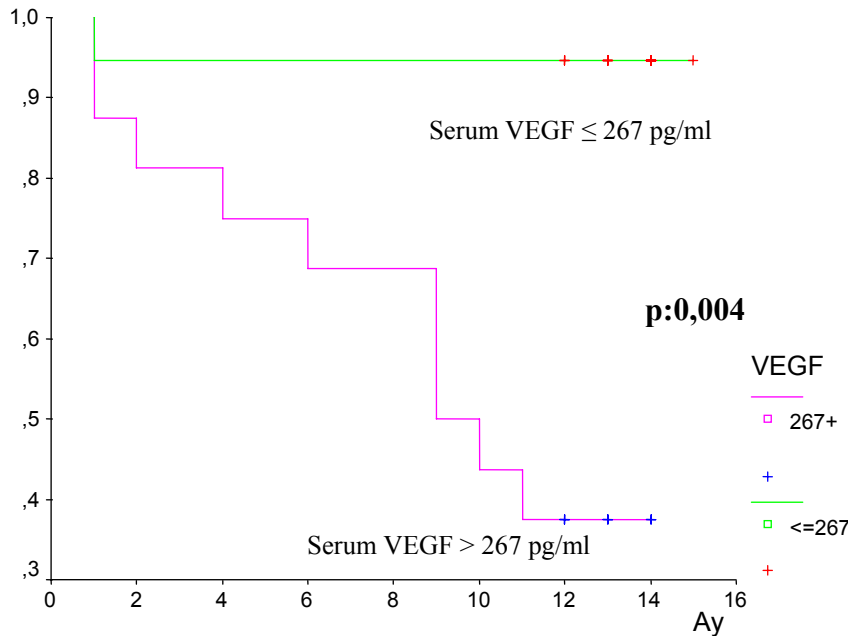
PARAMETRE	EŞİK DEĞER	P DEĞERİ
Yaş	≤ 65 ve > 65	0,758
Cinsiyet	E / K	0,125
PK Lökosit Sayısı	≤50.000/mm ³ ve > 50.000/mm ³	< 0,0001
PK Lenfosit Sayısı	≤50.000/mm ³ ve > 50.000/mm ³	0,002
Hemoglobin Düzeyi	≤ 12gr/dl ve > 12gr/dl	0,728
Trombosit Sayısı	≤150.000/mm ³ ve >150.000/mm ³	0,680
LDT	≤ 12 ay ve > 12 ay	0,02
Kİ Tutulum Şekli	Nondiffuz / Diffuz	0,027
Kİ Lenfosit Oranı	≤ % 70 ve > % 70	0,032
Kİ Lenfosit Oranı	≤ % 80 ve > % 80	0,1
CD 38 Pozitiflik Oranı	≤ % 7 ve > % 7	0,901
CD 38 Pozitiflik Oranı	≤ % 20 ve > % 20	0,343
CD 38 Pozitiflik Oranı	≤ % 30 ve > % 30	0,361
LDH	≤ üst sınırın ve > üst sınırın	0,296
B-2 M	≤ 2 mg/L ve > 2 mg/L	0,004
B-2 M	≤ 3,3 mg/L ve > 3,3 mg/L	0,017
Serum VEGF	≤ 267 pg/ml ve > 267 pg/ml	0,004

Binet A ve B KLL grubunda, vaka sayısının yeterli olmaması nedeniyle hastalık progresyonunda etkili faktörler çok yönlü analizlerde değerlendirilemedi, sadece tek yönlü analizler yapıldı. Binet A ve B evresindeki toplam 35 hastanın 11 tanesinde evre ilerlemesi

oldu. 5 hasta (% 46) Binet A'dan B'ye; 2 hasta (% 18) Binet A'dan C'ye; 4 hasta (% 36) Binet B'dan C'ye ilerledi. 3 hastada tedavi altında olmalarına rağmen evre değişimi gerçekleşti. Tedavi altında olanların hepsi Binet B evresindeydi. Serum VEGF düzeyi medyan değer (>267 pg/ml) üzerinde olanlardan 10 olguda evre ilerlemesi mevcuttu ve evre ilerleme süresi tanıdan itibaren medyan 18 ay (12-60), çalışma süresindeki izlem ile sınırlı değerlendirildiğinde ise 9 ay olarak bulundu. Serum VEGF düzeyi medyan değer (≤ 267 pg/ml) altında olanlardan sadece 1 olguda evre ilerlemesi mevcuttu ve bu grupta medyan süre oluşmadı.

Binet A ve B KLL hastalarında hastalık progresyonunuyla ilişkili faktörler aşağıda belirtilmiştir.

- 1) PK yüksek lökosit ve lenfosit sayılarının (sırasıyla $p: < 0,0001$, $p:0,002$)
- 2) LDT'nin 12 aydan kısa olmasının ($p:0,02$)
- 3) KI'nde yüksek lenfosit oranının ve diffuz tutulumun (sırasıyla $p:0,032$, $p:0,027$) ve
- 4) B-2 M düzeyinin hem laboratuvarımızın üst değerinden hem de hastaların ortalamasından yüksek olmasının hastalık progresyonu ile ilişkili olduğu bulundu. (sırasıyla $p:0,004$; $p:0,017$).
- 5) Aynı zamanda yüksek serum VEGF düzeyleri (>267 pg/ml) ile hastalık progresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptandı ($p:0,004$)(şekil 3).



Şekil-3. Binet A ve B KLL hastalarında hastalığızsız sağkalım eğrisi (Serum VEGF > medyan VEGF olan olgularda medyan progresyon süresi 9 ay, diğer grupta medyan oluşmadı. İzlem süresi çalışma ile sınırlı, medyan 13 ay)

5. Erken Evre KLL’de Hastalık Progresyonuna Etkili Faktörler

Erken evre KLL’de (Binet A) hastalık progresyonu ile serum VEGF düzeyi ve diğer prognoz parametreleri (yaş, cinsiyet, PK lökosit ve lenfosit sayısı, hemoglobin düzeyi, trombosit sayısı, LDT, Kİ tutulum şekli, Kİ’ndeki lenfosit oranı, CD 38 pozitiflik oranı, LDH ve B-2 M düzeyleri) arasındaki ilişki incelendi.

Binet A evresindeki tedavi altında olmayan 22 hastada hastalık progresyonu farklı bir grup olarak ayrıca değerlendirildi. Erken Evre KLL grubunda da, vaka sayısının yeterli olmaması nedeniyle hastalık progresyonunda etkili faktörler çok yönlü analizlerde değerlendirilemedi, sadece tek yönlü analizler yapıldı. Hastaların takipleri sırasında 7 hastada (% 32) evre ilerlemesi gerçekleşti. 5 hastada (% 71) Binet A’dan B’ye; 2 hastada da (% 29) Binet A’dan C’ye evre ilerlemesi oldu. Evre ilerlemesi gerçekleşen 7 hastanın tümünün serum VEGF düzeyleri medyan değer (>234 pg/ml) üzerinde bulundu. Serum VEGF düzeyleri medyan değer (>234 pg/ml) üzerinde olan bu hastaların tanı anından evre değişimine kadar olan süre medyan 20 ay, çalışma süresindeki izlem ile sınırlı değerlendirildiğinde ise 8 ay olarak bulundu. Medyan değer (≤ 234 pg/ml) altında serum VEGF düzeyine sahip erken evre KLL hasta grubunda hiçbir hastada progresyon görülmedi (medyan izlem süresi 13 ay).

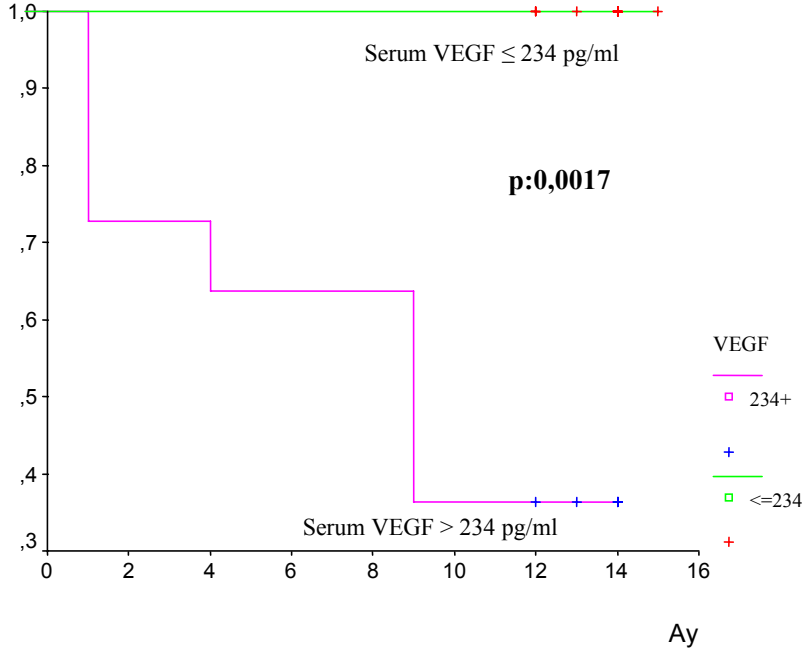
Erken evre KLL hastalarında prognoz parametrelerinin hastalık progresyonu ile ilişkisi Tablo 9’da gösterildi.

Erken evre KLL’de hastalık progresyonu ile ilişkili faktörler aşağıda belirtildi:

- 1) PK yüksek lökosit ve lenfosit sayılarının (sırasıyla p: 0,001, p:0,006)
- 2) LDT’nin 12 aydan kısa olmasının (p:0,001)
- 3) Kİ’nde yüksek lenfosit oranının (p:0,039) ve
- 4) B-2 M düzeylerinin hem laboratuvarımızın üst değerinden hem de hastaların ortalamasından yüksek olmasının erken evre KLL’de hastalık progresyonu ile ilişkili olduğu bulundu (sırasıyla p:0,021, p:0,001).
- 5) Yüksek serum VEGF düzeyleri (>234 pg/ml) erken evre KLL hasta grubunda hastalık ilerleme göstergesi olarak anlamlı bulundu (p:0,0017) (şekil 4).

TABLO 9 : Erken Evre KLL’de Hastalık Progresyonuna Etkili Faktörler

PARAMETRE	EŞİK DEĞER	P DEĞERİ
Yaş	≤ 65 ve > 65	0,972
Cinsiyet	E / K	0,112
PK Lökosit Sayısı	$\leq 50.000/\text{mm}^3$ ve $> 50.000/\text{mm}^3$	0,001
PK Lenfosit Sayısı	$\leq 50.000/\text{mm}^3$ ve $> 50.000/\text{mm}^3$	0,006
Hemoglobin Düzeyi	$\leq 12\text{gr/dl}$ ve $> 12\text{gr/dl}$	0,941
Trombosit Sayısı	$\leq 150.000/\text{mm}^3$ ve $150.000/\text{mm}^3$	0,801
LDT	≤ 12 ay ve > 12 ay	0,001
Kİ Tutulum Şekli	Nondifuz / Diffuz	0,1
Kİ Lenfosit Oranı	$\leq \%70$ ve $> \%70$	0,039
Kİ Lenfosit Oranı	$\leq \% 80$ ve $> \% 80$	0,817
CD 38 Pozitiflik Oranı	$\leq \%7$ ve $> \%7$	0,817
CD 38 Pozitiflik Oranı	$\leq \%20$ ve $> \% 20$	0,190
CD 38 Pozitiflik Oranı	$\leq \% 30$ ve $> \% 30$	0,244
LDH	\leq üst sınırın ve $>$ üst sınırın	0,247
B-2 M	≤ 2 mg/L ve > 2 mg/L	0,021
B-2 M	$\leq 3,3$ mg/L ve $> 3,3$ mg/L	0,001
Serum VEGF	≤ 234 pg/ml ve > 234 pg/ml	0,0017



Şekil-4. Erken evre KLL (Binet A) hastalarında hastaliksız sağkalım eğrisi (Serum VEGF > medyan VEGF olan olgularda medyan progresyon süresi 8 ay, diğer grupta medyan oluşmadı. İzlem süresi çalışma ile sınırlı, medyan 13 ay).

6. KLL'de Yaşam Süresine Etkili Faktörler

Çalışmamızda izleme süresi içinde kaybedilen hastalar ile sağkalan hastalara ait prognoz parametreleri (serum VEGF düzeyi, yaş, cinsiyet, PK lökosit ve lenfosit sayısı, hemoglobin düzeyi, trombosit sayısı, LDT, Kİ tutulum şekli, Kİ'ndeki lenfosit oranı, CD 38 pozitiflik oranı, LDH ve B-2 M düzeyleri) de karşılaştırıldı. Yaşam süresine etkili olan faktörler Tablo 10'da gösterildi.

Toplam 46 hastadan 5 hasta (% 11) tez çalışması sırasında yaşamını yitirdi. 5 hastadan 2 hasta(% 40) Binet B, 3 hasta (% 60) Binet C evresindeydi. Rai evrelendirme sistemine göre de 1 hasta (% 20) Rai II; 2 hasta (% 40) Rai III ve 2 hasta da (% 40) Rai IV evresindeydi. 5 hastanın tümü KLL seyri sırasında gelişen hastalık aktivasyonu nedeniyle yaşamını yitirdiler. Kaybedilen hastaların tümü; serum VEGF düzeyleri açısından medyan değer (>267 pg/ml) üzerinde olan olgulardı ve tanı anından ölüme kadar geçen süre medyan 20 ay, çalışma başlangıcı ile ölüm arasındaki süre ise medyan 7 ay bulundu.

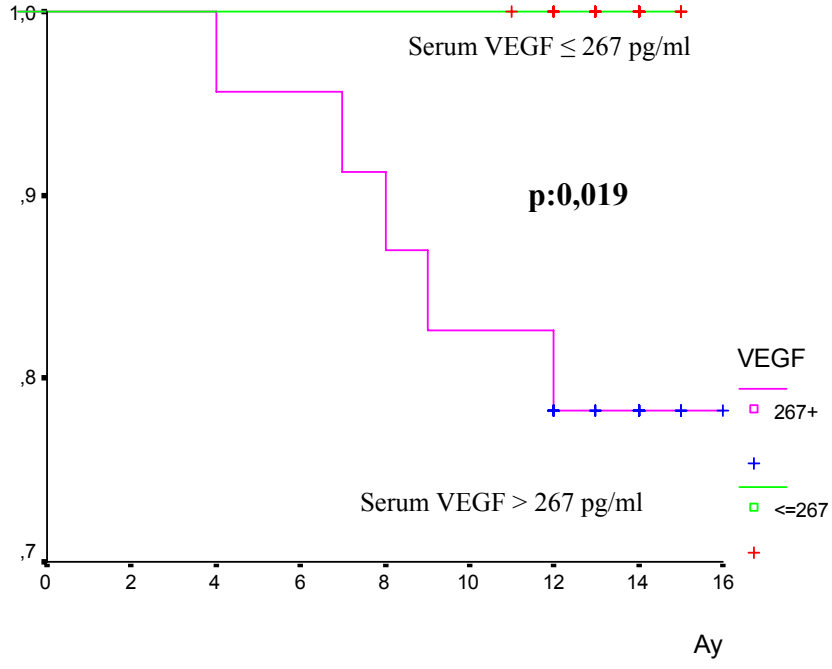
Yaşam süresini olumsuz yönde etkileyen faktörler aşağıda belirtildi:

- 1) PK yüksek lökosit ve lenfosit sayıları (sırasıyla p:0,007, p:0,001)
- 2) Düşük trombosit sayısı (p:0,004)

- 3) LDT'nin 12 aydan kısa olması (p:0,017)
- 4) Kİ'nde yüksek lenfosit oranının olması (p:0,022)
- 5) Lösemik hücrelerde % 30'dan fazla CD 38 pozitiflik oranı (p:0,008)
- 6) Yüksek B-2 M düzeyleri (>3,3 mg/L) (p:0,014)
- 7) Hastaların Binet ve Rai sistemine göre ileri evrede olması (sırasıyla p:0,01, p:0,024) ve
- 8)Yüksek serum VEGF düzeyleri (>267 pg/ml) kısa yaşam süresi ile ilişkili bulundu (p:0,019) (şekil 5).

TABLO 10: KLL'de Yaşam Süresine Etkili Faktörler

PARAMETRE	EŞİK DEĞER	P DEĞERİ
Yaş	≤ 65 ve > 65	0,137
Cinsiyet	E / K	0,706
PK Lökosit Sayısı	≤50000/mm ³ ve > 50000/mm ³	0,007
PK Lenfosit Sayısı	≤50000/mm ³ ve > 50000/mm ³	0,001
Hemoglobin Düzeyi	≤ 12gr/dl ve > 12gr/dl	0,08
Trombosit Sayısı	≤150000/mm ³ ve >150000/mm ³	0,004
LDT	≤ 12 ay ve > 12 ay	0,017
Kİ Tutulum Şekli	Nondiffüz / Diffüz	0,1
Kİ Lenfosit Oranı	≤ %70 ve > %70	0,523
Kİ Lenfosit Oranı	≤ % 80 ve > % 80	0,022
CD 38 Pozitiflik Oranı	≤ %7 ve > %7	0,823
CD 38 Pozitiflik Oranı	≤ %20 ve > % 20	0,120
CD 38 Pozitiflik Oranı	≤ % 30 ve > % 30	0,008
LDH	≤ üst sınırın ve > üst sınırın	0,735
B-2 M	≤ 3,3 mg/L ve > 3,3 mg/L	0,014
Rai	0-1 ve 2-3-4	0,024
Binet	A ve B-C	0,01
Serum VEGF	≤ 267 pg/ml ve > 267 pg/ml	0,019



Şekil-5. KLL hastalarında yaşam eğrisi (Kaybedilen hastaların tümünde serum VEGF > medyan VEGF olan olgulardı ve medyan ölüme kadar geçen süre 7 ay olarak bulundu. İzlem süresi çalışma ile sınırlı, medyan 13 ay).

TARTIŞMA

Son yıllarda otomatik kan sayım makinelerinin yaygınlaşması ile KLL hastalarının büyük bir kısmına erken evrede tanı konulmaktadır. Erken evrede tanı konulan hastalar genellikle tanı sırasında tedavi edilmezler. Geriye kalan ve ileri evrede tanı konulan hastalar daha yüksek tümör kitlesine sahip olup; bunlarda tanı sırasında veya kısa bir süre içinde tedavi ihtiyacı ortaya çıkar (3,4,10).

Erken evre olarak kabul edilen hastaların % 50-60'ında takiplerinde de uzun süre hiç tedavi ihtiyacı olmamaktadır. Bunlarda tedaviden bağımsız olarak uzun bir yaşam süresi mevcut olup KLL dışı nedenlerden yaşamlarını yitirmektedirler. Erken evredeki diğer % 40-50 hastada ise tanıdan bir süre sonra hastalık ilerlemekte ve tedavi ihtiyacı ortaya çıkmaktadır. Bu hasta grubunun bir kısmı hastalık nedeniyle kaybedilmektedir. Hastalığın bu farklı klinik davranışlarının moleküler özellikler ile ilişkili olduğu ve IgVH mutasyonlarının varlığına göre aynı hastalığın iki farklı varyantı olduğu öne sürülmüştür (4).

Erken evredeki olgulardan hangilerinin ilerleyici özellik göstereceği, hangilerinin sessiz seyredeceğini tanı sırasında belirlemek prognoz ve tedavi seçeneklerini değerlendirmek açısından önemlidir. Bu yüzden erken evredeki hastaların hangisine, ne zaman tedavi başlanacağı sorgulanmaya başlanmıştır. Rai ve Binet evreleme sistemleri farklı evreleri karşılaştırmada prognoz açısından bilgi vermekle birlikte; erken evre hastaları daha sonraki hastalık seyrine göre tanı sırasında gruplamada yetersizdir. Bu nedenle erken evre KLL'de bir kısmı kesin olmamakla beraber evre dışında; evre ile birlikte veya evreden bağımsız olarak anlamlı olduğu bilinen birçok yeni prognoz parametreleri belirlenmeye çalışılmıştır (11,12).

Bu prognoz parametrelerinden biri de VEGF düzeyidir. Son yıllarda tümör gelişim patogeneğinde anjiogenez üzerinde çokça durulmaktadır. Solid tümörlerde ve bazı lösemilerde yapılan araştırmalarda anjiogenezin kötü prognoz ile ilişkisi gösterilmiştir (52-61). KLL'de kemik iliğinde anjiogenezin arttığına işaret eden çalışmalar da mevcuttur (13-17). VEGF, anjiogenezde etkili olan en önemli faktörlerden biridir. KLL olgularının da dahil edildiği bir grup habis hematolojik hastalıkta yapılan bir çalışmada; KLL olgularının kemik iliğinde anjiogenez artışı gözlenmez iken plazma VEGF düzeyleri yüksek bulunmuştur (63). Aynı grubun bir diğer çalışmasında şaşırtıcı şekilde, hücre içi VEGF düzeylerinin KLL olgularında prognoz ile (yaşam süresi) zıt yönlü bir ilişki gösterdiği belirtilmiştir. Ancak bu

çalışmada hücre içi VEGF düzeylerinin bu özelliği daha çok erken evre olgular ile düşük B-2 M olan olgularda dikkat çekici bulunmuş ve VEGF ekspresyonunun hastalık ilerledikçe azaldığı ifade edilmiştir (67). Aguayo ve arkadaşlarının bir grup habis hematolojik hastalıkta yaptığı bir çalışmada; anjiogenez artış göstergesi olarak plazma b-FGF düzeylerinin en yüksek olduğu hastalık grubunun KLL olduğu belirtilmiştir (63). Buna karşılık sadece KLL olgularında yapılan bazı çalışmalarda KLL’de b-FGF düzeyleri hastalık progresyonu için bir prognoz parametresi olarak ortaya çıkmamıştır (15,16). Bu çalışmalarda ve bunları izleyen diğer çalışmalarda da doğrudan KLL’de anjiogenez belirteci olarak VEGF düzeyinin prognoz değeri üzerinde durulmuştur (15,16,66).

Özellikle erken evre KLL’de VEGF düzeyleri ile hastalık progresyonu ilişkisine işaret eden çalışmalar mevcuttur (15,16). VEGF tayini için serum veya plazma örnekleri kullanılmıştır. Bazı araştırmacılar serum VEGF düzeylerinin plazma VEGF düzeyine göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (63). Molica ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; özellikle trombositlerin varlığından etkilenebileceği kaygısı ile serum ve plazma VEGF düzeylerinin farklı olup olmadığı araştırılmış ve KLL olgularında bu hususun bir fark oluşturmadığı belirtilmiştir (15).

Biz de çalışmamızda serum VEGF düzeylerinin yaş, cinsiyet, PK lökosit ve lenfosit sayısı, hemoglobin düzeyi, trombosit sayısı, LDH, B-2 M, Kİ tutulumu, CD 38 pozitiflik oranı gibi prognoz parametreleri ile ilişkisini ve hastalık progresyonuna etkisini araştırdık. Sağlıklı 20 bireyi de kontrol grubu olarak aldık.

Literatüre uygun olarak hastaların medyan yaşı 66, erkek kadın oranı 2,1 olup tanı anında hastaların büyük bir kısmı erken evredeydi (% 54’ü Binet A veya % 74’ü Rai O-II) (15,16,64,67). Serum VEGF düzeyini literatürde rastladığımız diğer çalışmalardaki gibi ELİSA yöntemi ile değerlendirdik (15,16). Bir tez çalışması olarak bu çalışmadaki zaman sınırı nedeniyle uzun süreli takip ve yaşam süresini izleme şansımız olamayacağından takip parametresi olarak bazı başka çalışmalarda olduğu gibi hastalık progresyonu (Binet evreleme sistemine göre bir üst evreye geçiş) ele alındı (15,16). Ayrıca sınırlı izleme süresi içinde kaybedilen hastalar ve yaşamını sürdüren hastalar karşılaştırıldı.

Çalışmamızda KLL hasta grubunun serum VEGF düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu bulgu sadece erken evre KLL olguları dikkate alındığında da

geçerliydi. Çalışmamıza benzer kurgusu olan başka çalışmalarda da erken evre KLL'li hastaların serum VEGF düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu doğrulayan sonuçlar bildirilmiştir (15,16). Plazma VEGF düzeyleri de çalışıldığında KLL hastalarında kontrol grubuna göre yüksek olduğu bilinmektedir (63).

Çalışmamızda KLL olgularında bilinen prognoz parametreleri değerlendirildi ve beklendiği şekilde Binet A ve B hasta grubunda yüksek PK lökosit ve lenfosit sayısının, LDT'nin 12 aydan kısa olmasının, yüksek B-2 M düzeyinin, KI'nde yüksek lenfosit oranının ve diffuz tutulumun hastalık progresyonu ile ilişkili olduğu saptandı. Sadece erken evre hasta grubunda ise yüksek PK lökosit ve lenfosit sayısının, LDT'nin 12 aydan kısa olmasının, yüksek B-2 M düzeyinin, KI'nde yüksek lenfosit oranının da hastalık progresyonu ile ilişkili olduğu bulundu.

KLL grubunda yüksek serum VEGF düzeyleri ile Rai ve Binet'e göre ileri evrede olmak, yüksek PK lökosit ve lenfosit sayısı, KI'nde diffuz tutulum şekli ve KI'ndeki yüksek lenfosit oranı arasında pozitif ilişki saptadık. Söz konusu sonuçlar literatürdeki bulgulara benzerdir (15,16). Çalışmamızda serum VEGF düzeyi ile ilişkisini araştırdığımız diğer prognoz parametrelerinden LDH, LDT, B-2 M ve CD 38 pozitiflik oranı arasında anlamlı ilişki gösteremedik. Ancak olgularımızın çoğunluğu erken evre olgulardan oluşmaktaydı ve bu özellik ve genel olarak hasta sayımızın azlığı nedeniyle bu parametreler ile ilgili anlamlı bir farka ulaşamamış olabileceğimizi düşünüyoruz.

KLL'de CD 38 pozitiflik oranının prognoz parametresi olduğu gösteren yayınlar mevcuttur (35-37). Birçok çalışmada CD 38 pozitiflik oranı için eşik değer % 7, 20 ve 30 gibi farklı değerler kullanılmıştır (35-38). Çalışmamızda hastalar her üç eşik değer kullanılarak değerlendirilmiştir. Serum VEGF düzeyleri ile her üç eşik değerde (% 7, % 20, % 30) yapılan karşılaştırmalar sonucunda; eşik değer üstünde yüksek CD 38 pozitifliği olanlarda daha yüksek VEGF düzeyleri saptanmakla birlikte sadece % 20 eşik değer sınır alındığında anlamlılık sınırına yaklaşılabilmiştir (p:0.076). Hem Binet A ve B evresindeki olguların tümü hem de sadece erken evre KLL hasta gruplarında üç eşik değerde incelenen CD 38 pozitiflik oranının hastalık progresyonuyla da anlamlılık düzeyinde ilişkisi gösterilememiştir. Buna karşılık CD 38 pozitiflik oranının % 30'un üzerinde olmasının kısa yaşam süresi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Çalışmamızdaki olguların çoğunluğunun erken evrede olması, buna karşılık çalışma sırasında kaybedilen hastaların hepsinin ileri evrede olup; agresif bir

hastalığa sahip olmaları bu sonuçlarda doğrudan etkili olmuş olabilir. Yüksek tümör kitlesi olan ve kaybedilen hastaların yüksek CD 38 pozitiflik oranının olması bu nedenle şaşırtıcı bir bulgu değildir. VEGF ile ilişkisi olmamasına karşılık ölen hastalarda daha yüksek CD 38 pozitiflik oranının saptanmasında CD 38 pozitiflik oranının KLL’de hastalık seyri sırasında değişken bir parametre olarak davranıyor olmasının da rolü olabilir. Gerçekten de başka bazı çalışmalarda da belirtildiği kadarıyla CD 38 pozitiflik oranı hastalığın seyri sırasında değişebilmektedir (39-40).

Çalışmamızda VEGF ile LDT arasındaki ilişki incelendiğinde LDT kısa (<12 ay) olanlarda serum VEGF düzeyi daha yüksek olmakla birlikte fark anlamlılık sınırında değildi. Aynı şekilde B-2 M düzeyi yüksek olanlarda (eşik değer ortalama alındığında) daha yüksek serum VEGF düzeyleri saptanmakla birlikte burada da fark anlamlı düzeyde bulunmadı. Olgu sayımızın az oluşunun bu sonuçlara yol açtığını düşünmek mümkündür.

Çalışmamızda amacımız bilinen ve rutinleşmiş prognoz parametrelerini test etmek değildir. Ancak serum VEGF düzeyinin bu parametrelerden hiç değilse bir kısmı ile birlikte hareket ediyor olmasının gösterilmesinin VEGF’nin prognoz parametresi özellikleri taşıdığına dolaylı bir göstergesi olduğunu düşünüyoruz.

Olgu sayımızın azlığı nedeniyle çok yönlü analiz gerçekleştirememiş olmakla birlikte hem Binet A ve B hem de erken evre (Binet A) KLL hasta gruplarında serum VEGF düzeyi ile hastalık progresyonu arasında anlamlı ilişki bulundu. Erken evre KLL hasta grubumuzda, tümü yüksek (medyanın üzerinde) VEGF düzeyine sahip olgular olmak üzere, hastaların % 32’sinde evre ilerlemesi gerçekleşmiştir. Yüksek serum VEGF düzeyine sahip olanlarda hastalık progresyonuna kadar geçen süre tanıdan itibaren medyan 20 ay, çalışma süresi (medyan 13 ay) başlangıcından itibaren medyan 8 ay olarak bulunmuştur. Düşük serum VEGF düzeyi olanlarda medyan değer henüz oluşmamıştır. Literatürde erken evre (Binet A) dışındaki olgularda yapılmış bu tür bir analize rastlamadık. Buna karşılık bu sonuçlar literatürde rastladığımız ve bu konuda yapılmış en geniş seriyi de içeren, Molica ve arkadaşlarının erken evre KLL hasta grubunda yaptığı iki çalışmayla uyumludur (15,16). İki çalışmada da erken evre olgularda hastalık progresyonunda serum VEGF düzeyi tek yönlü analizde anlamlı bulunurken, çok yönlü analizde ise anlamlı bulunmamıştır.

Çalışmamızda yüksek lökosit ve lenfosit sayısı varlığı, düşük trombosit sayısı, LDT’nin 12 aydan kısa olması, Kİ’nde yüksek lenfosit sayısı, CD 38 pozitiflik oranının % 30’un üzerinde

olması, yüksek B-2 M düzeyi, Binet ve Rai sistemine göre ileri evrede olmak ve yüksek serum VEGF düzeyi kısa yaşam süresi ile ilişkili bulundu. Serum VEGF dışındaki prognoz parametrelerinin bu şekilde bulgu vermeleri şaşırtıcı olmamakla birlikte VEGF düzeyinin bu bakış açısı ile de diğer prognoz parametreleri ile aynı yönde bulgu vermesi anlamlıdır.

Çalışmamızın eksik veya eleştiriye açık yanları mevcuttur. Olgu sayısının azlığı ve olguların tümünde tanı anındaki VEGF düzeylerinin bakılmamış olması sonuçlarımızı etkilemiş olabileceği gibi VEGF'nin hastalık seyrinde değişiklik gösteren bir parametre olup olmadığını açıklayabilmemizi de engeller niteliktedir. Hastaların bir tez çalışmasının izin verdiği ölçüde, nispeten kısa bir süre izlenebilmiş olması bir diğer eksikliklerdir. Bu nedenle uzun süreli yaşam analizleri yapılamamış ve prognoz tayini açısından bir bakışa göre en önemli inceleme eksik bırakılmıştır. Değerlendirmelerimiz tek yönlü analizlerle sınırlı kalmış, olgu sayısının azlığı çok yönlü analizlerin yapılmasına izin vermemiştir. Son yıllarda üzerinde en fazla durulan prognoz parametreleri olan ancak tetkik güçlüğü nedeniyle rutin olarak yapılamayan bazı prognoz verileri (ZAP 70, IgVH, sitogenetik inceleme) ile serum VEGF düzeyi arasındaki ilişki bu çalışmada incelenmemiştir.

Sonuç olarak serum VEGF düzeyi KLL olgularında normallere göre daha yüksek olup bilinen bazı klasik prognoz parametreleri ile aynı yönde hareket etmekte kalmayıp, hastalık progresyonu ve sağkalım ile ilişkili bir parametre olabileceği yönünde bulgular elde edilmiştir. Sadece erken evredeki olgular dikkate alındığında da bu özelliği gözlenebilmiştir. Bu nedenle daha geniş olgu serilerinde uzun süreli takipler ve çok yönlü analizlerde de önemi gösterilebildiği takdirde sadece ELISA ile tetkik edilebiliyor olması nedeniyle klinik kullanımda yararlanılabilecek bir parametre olabilir. Buna karşılık serum VEGF düzeyinin normal değer aralığının standart hale getirilmemiş olmasının rutin klinik kullanımda güçlük oluşturabileceğini de düşünmekteyiz.

ÖZET

Kronik Lenfositik Lösemi Tanılı Hastalarda Vasküler Endotel Büyüme Faktör (VEGF) Düzeylerinin Prognozla İlişkisi

Dr. Esra TERZİ

KLL'de prognozun değerlendirilmesinde standart metot olarak kullanılan Rai ve Binet evreleme sistemleri erken evre KLL hastalarının hangilerinin daha sonra hızlı seyredeceğini ayırmada yetersizdir. Bu nedenle son yıllarda evreleme dışındaki prognoz parametreleri önem kazanmaktadır. Özellikle, erken evre KLL'de serum VEGF düzeylerinin hastalık progresyonunu belirlemede önemli bir parametre olabileceği öne sürülmüştür.

Çalışmamızda KLL tanılı 46 hasta ile 20 sağlıklı kontrolde ELİSA yöntemi ile serum VEGF düzeyleri belirlenerek medyan 13 aylık takipte hastalık progresyonu ile ilişkisi incelendi. Hastaların 25'i Binet A, 10'u Binet B, 11'i Binet C evresindeydi. Tedavi altında olmayan Binet A KLL tanılı 22 hasta; erken evre KLL grubu olarak ayrıca değerlendirildi. Hem KLL olgularının tümünün hem de erken evre KLL grubunun medyan serum VEGF düzeyleri (267 pg/mL, 234 pg/ml) kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti (ikisi $p < 0.0001$). Yüksek serum VEGF düzeyleri ile yüksek lökosit-lenfosit sayısı (ikisi $p:0.001$), ileri Binet-Rai evreleri ($p:0.027$, $p:0.038$), KI'nde diffuz tutulum ve yüksek lenfosit oranı ($p:0.007$, $p:0,015$) arasında anlamlı ilişki saptandı. Binet A ve B evrelerindeki KLL grubunda yüksek serum VEGF düzeyi (>267 pg/mL) ile hastalık progresyonu açısından anlamlı ilişki saptandı ($p:0,004$). Erken evre KLL olgularında da yüksek serum VEGF düzeyi (>234 pg/ml) ile hastalık progresyonu açısından anlamlı ilişki saptandı ($p:0,0017$). Aynı zamanda yüksek serum VEGF düzeylerinin kısa yaşam süresiyle de ilişkili olduğu bulundu ($p:0,019$).

Sonuç olarak serum VEGF düzeyi KLL olgularında normallere göre daha yüksek olup, hastalık progresyonu veya sağkalım ile ilişkili bir parametre olabileceği yönünde bulgular elde edilmiştir. Bu nedenle daha geniş olgu serilerinde uzun süreli takipler ve çok yönlü analizlerde önemi gösterilebildiği takdirde sadece ELISA ile tetkik edilebiliyor olması nedeniyle klinik kullanımda yararlanılabilecek bir parametre olabilir.

SUMMARY

The Association Between Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Levels And Prognosis In Patients Chronic Lymphocytic Leukemia

Dr. Esra TERZÌ

Rai and Binet staging system used as a standart method for evaluating the prognosis of CLL is insufficient in distinguishing the early stage CLL patients that will progress rapidly. Because of this, prognostic parameters except staging has become important in the recent years. It's suggested that serum VEGF levels in the early stage CLL may be an important parameter in determining the progression of the disease.

We detected the serum levels of VEGF in 46 CLL patients and 20 healthy controls with the use of ELISA method and analysed the relationship with the disease progression during the follow-up period with a median of 13 months. 25 of the total patients were in Binet A while 10 of them were in Binet B and 11 were in Binet C. We evaluated the serum levels of VEGF in 22 Binet A CLL patients who were not getting any treatment. Both the whole CLL patients group and the early stage CLL patients group had higher median serum levels of VEGF (267 pg/mL, 234 pg/ml) compared to the control group (p: <0,0001 for both). Elevated the serum levels of VEGF positively correlated with elevated peripheral blood leukocytosis and lymphocytosis (p:0,001 for both); advanced Binet and Rai stage (p: 0,027, p: 0,038) and the diffuse pattern of BM involvement and elevated BM lymphocytosis (p: 0,007, p: 0,015). Higher median value of serum VEGF levels (>267 pg/ml) were associated with a shorter time of disease progression in Binet A and B CLL patients (p: 0,004). High median value of serum VEGF levels (>234 pg/ml) in the early stage CLL patients have also correlated with disease progression (p: 0,0017). We also found that high serum VEGF levels correlate with a short life span (p: 0,019).

As a result, we found that the serum levels of VEGF in the CLL patients are higher than the control group and it can be a parameter associated with the disease progression and survival. For this reason and because the simplicity of analyzing with ELISA, it can be a useful clinical parameter, after its importance have been shown in larger and multi-variate studies.

KAYNAKLAR

1. Cheson B, Bennett 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(12): 4990-4997.
2. Rozman C, Montserrat E. Current concepts: chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1995; 333(16): 1052-1057.
3. Montserrat E, Vinolas N, Reverter JC, et al. Natural history of chronic lymphocytic leukemia: on the progression and prognosis of early stages. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1988; 30(5-6): 359-361.
4. Dighiero G. CLL biology and prognosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005;:278-84.
5. International Workshop Chronic Lymphocytic Leukemia. Chronic lymphocytic leukemia: recommendations for diagnosis, staging and response criteria. *Annals of Int Med*. 1989; 110: 236-238.
6. Rai Kr, Sawitsky A, Cronkite EP; et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975; 46(2): 219-234.
7. Binet J, Augier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981; 48(1): 198-206.
8. Dighiero G, Maloum K, Desablens B, et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 1998; 338(21): 1506-1514.
9. CLL Trialists Collaborative Group. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta analysis of the randomized trails. *J Natl Cancer Inst*. 1999; 91(10): 861-868.
10. Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biology insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood*. 2004; 103(4): 1202-1210.
11. Oscier D, Fegan C, Hillman P, et al. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J of Haematol*. 2004; 125(3): 294-317.
12. Montillo M, Hamblin T, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica*. 2005; 90(3): 391-399.

13. Peterson L, Kini AR. Angiogenesis is increased in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001; 97(8): 2529.
14. Menzel T, Rahman Z, Calleja P, et al. Elevated intracellular of basic fibroblastic growth factor correlate with stage of chronic lymphocytic leukemia and is associated with resistance to Fludarabina. *Blood*. 1996; 87(3): 1056-1063.
15. Molica S, Vitelli G, Levato D, et al. Clinicoprognostic implications of increased serum levels of vascular endothelial growth factor and basic fibroblastic growth factor in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Cancer*. 2002; 86(1): 31-35.
16. Molica S, Vacca A, Ribatti D, et al. Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002; 100(9): 3344-3351.
17. Kini AR, Kay NE, Peterson LC. Increased bone marrow angiogenesis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2000; 14(8): 1414-1418.
18. Kalil N, Cheson B. Chronic lymphocytic leukemia. *The Oncologist*. 1999; 4(5): 352-369.
19. Hallek M. New concepts in the pathogenesis, diagnosis, prognostic factors and clinical presentation of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*. 2000; 4: 103-117
20. Pamuk ON, Pamuk GE, Soysal T, et al. An overview of young CLL patients: a single center experience from Turkey. *Haematologia*. 2002; 31(4): 303-311.
21. Rozman C, Montserrat E, Rodriguez-Fernandez JM, et al. Bone marrow histologic pattern: the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivarieta survival analysis of 329 cases. *Blood*. 1984; 64(3): 642-653.
22. Geisler CH, Hou-Jensen K, Jensen OM, et al. The bone marrow infiltration pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia is not an important prognostic factor. Danish CLL Study Group. *Eur J Haematol*. 1996; 57(4): 292-300.
23. Spati B, Child J, Keruish S, et al. Behaviour of serum beta 2-microglobulin and acute phase reactant proteins in chronic lymphocytic leukemia:a multicentre study. *Acta Haematol*. 1980; 64(2): 79-86.
24. Molica S, Levato D, Casvilla N, et al. Clinicoprognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and beta 2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*. 1999; 62(2): 117-122.
25. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000; 343(26): 1910-1916.
26. Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, et al. 11 q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterised by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*. 1997; 89(7): 2516-2522.

27. Döhner H, Fischer K, Bentz M, et al. P53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*. 1995; 85: 1580-1588.
28. Byrd JC, Smith L, Hackbarth ML, et al. Interphase cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia may predict response to rituximab. *Cancer Res*. 2003; 63: 36-38.
29. Naylor M, Capra D. Mutational status of IgVh genes provides clinically valuable information on B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94: 1937-1939.
30. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated IgVH genes are associated with more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94(6): 1848-1854.
31. Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. Zap-70 expression as a surrogate for Immunoglobulin-Variable-Region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med*. 2003; 348(18): 1764-1775.
32. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, et al. Zap-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated Immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003; 101(12): 4944-4951.
33. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. Zap-70 expression as with Immunoglobulin-Heavy-Chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med*. 2004; 351(9): 893-901.
34. Dürig J, Nüchel H, Cremer M, et al. ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2003; 17(12): 2426-2434.
35. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig VH gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94(6): 1840-1847.
36. Ghia P, Guida G, Stella S, et al. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia patient at risk of disease progression. *Blood*. 2003; 101(4): 1262-1269.
37. Massimo G, Mauro FR, Calabrese E, et al. The prognostic value CD 38 expression in chronic lymphocytic leukemia patients studied prospectively at diagnosis: a single institute experience. *Br J of Haem*. 2005; 130: 549-557.
38. Krober A, Seiler T, Benner A, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002; 100(4): 1410-1416.
39. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic

leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 2002; 99(3): 1023-1029.

40. Ibrahim S, Keating M, Do KA, et al. CD 38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001; 98(1): 181-186.

41. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998; 91(10): 3527-3561.

42. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circ*. 2002; 105(9): 1135-1143.

43. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, et al. Randomized, single blind, placebo controlled pilot study of catheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circ*. 2001; 103(17): 2138-2143.

44. Matsui K, Yoshioka T, Murakami Y, et al. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor and monocyte-colony stimulating factor in peripheral arterial disease. *Circ J*. 2003; 67(8): 660-662.

45. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluids of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *New Eng J Med*. 1994; 331(22): 1480-1487.

46. Tımar J, Döme B, Fazekas K, et al. Angiogenesis-dependent disorders and angiogenesis therapy. *Pathol Oncol Res*. 2001; 7(2): 85-94.

47. Folkman J. *Seminars In Medicine Of The Beth Israel Hospital, Boston*. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Eng J Med*. 1995; 333: 1757.

48. Ribatti D, Vacca A, Presta M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol*. 2000; 35(5): 227-231.

49. Grosman J, Grosman W. Angiogenesis. *Rev In Card Med*. 2002, Vol 3 No3: 138-144.

50. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *The Onco*. 2004; 9 (suppl 1): 2-10.

51. Fons P, Herault JP, Tuyaret J, et al. VEGF-R2 and Neurophilin-1 are involved in VEGF-A induced differentiation of human bone marrow progenitor cells. *J Cell Physiol*. 2004; 200(3): 351-359.

52. Desruisseau S, Palmari J, Giusti C, et al. Clinical relevance of Amphiregulin and VEGF in primary breast cancers. *Int J Cancer*. 2004; 111(5): 733-740.

53. Iwasaki A, Kuwahara M, Yoshinaga Y, et al. Basic fibroblast growth factor (b-FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels, as prognostic indicators in NSCLC. *Euro J of CardioThorac Sur.* 2004; 25(3): 443-448.
54. Akbulut H, Altuntas F, et al. Prognostic role of serum vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor and nitric oxide in patients with colorectal carcinoma. *Cytokine.* 2002 ;20(4):184-90.
55. Kohli M, Kaushal V, Spencer HJ, et al. Prospective study of circulating angiogenic markers in prostate-specific antigen (PSA)-stable and PSA-progressive hormone-sensitive advanced prostate cancer. *Urology.* 2003 ;61(4):765-9.
56. Yue SQ, Yang YL, Zhou JS, et al. Relationship between ürokinase-type plasminojen activator receptor and vascular endothelial growth factor expression and metastasis of gallbladder cancer. *World J Gastroent.* 2004; 10(18): 2750-2752.
57. Poon RT, Ho JW, Tong CS, et al. Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Brit J Sur.* 2004; 91(10): 1354-1360.
58. Fiedler W, Graeven U, Ergun S, et al. Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. *Blood.* 1997; 89(6): 1870-1875.
59. Wrobel T, Mazur G, Surowiak P, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in bone marrow of multiple myeloma patients. *Eur J Intern Med.* 2003; 14(2): 98-100.
60. Salven P, Orpana A, Teerenhovi L, et al. Simultaneous elevation in the serum concentrations of the angiogenic growth factors VEGF and bFGF is an independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin's Lymphoma: a single-institution's study of 200 patients. *Blood.* 2000; 96(12): 3712-3718.
61. Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, et al. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol.* 1997; 150(3): 815-821.
62. Salven P, Teerenhovi L, Joensuu H, et al. A high pretreatment serum vascular endothelial growth factor concentration is associated with poor outcome in non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood.* 1997; 90(8): 3167-3172.
63. Aguayo A, Kantarjian H, Manshour T, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2000; 96(6): 2240-2245.

64. Chen H, Treweeke AT, West DC, et al. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2000; 96(9): 3181-3187.
65. Molica S, Santoro R, Digiesi G, et al. Vascular endothelial growth factor isoforms 121 and 165 are expressed on B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*. 2000; 85(10): 1106-1108.
66. Gora-Tybor J, Blonski JZ, Robak T. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) and its soluble receptors in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur Cytokine Netw*. 2005; 16(1): 41-46 (abstract).
67. Aguayo A, O'Brien S, Keating M, et al. Clinical relevance of intracellular vascular endothelial growth factor levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2000; 96(2): 768-770.