

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

Tüylü Hücreli Lösemide *BRAF* V600E Mutasyonunun Araştırılması



**Uzmanlık Tezi
Dr. Deniz ÖZMEN**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Melih AKTAN**

**İSTANBUL
2015**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

Tüylü Hücreli Lösemide *BRAF* V600E Mutasyonunun Araştırılması

**Uzmanlık Tezi
Dr. Deniz ÖZMEN**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Melih AKTAN**

**Bu tez İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
(Proje No: 26944 olarak) desteklenmiştir.**

**İSTANBUL
2015**

TEŞEKKÜR

Tıp fakültesindeki üçüncü yılımda tanıştığım ve İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda tıpta uzmanlık eğitim sürem boyunca kendileriyle çalışmaktan onur duyduğum, asistanlık eğitimimi tamamlamamda emekleri olan, deneyim ve bilgilerini benimle sevgiyle ve cömertçe paylaşan başta tez danışma hocam Prof. Dr. Melih AKTAN ve Prof. Dr. Meliha NALÇACI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim sürem boyunca her türlü idari ve bilimsel desteği veren, kendini tanımaktan büyük mutluluk duyduğum İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şükrü PALANDÜZ'e ve tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Hasta ve kontrollerden kan alımını yapan hemşire ve laboratuvar personeline, BRAF mutasyon analizini yapan Bio. Dr. Aynur Dağlar'a teşekkürlerimi sunarım.

Varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim, karşılıksız sevgi ve desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili anneme ve babama şükranlarımı sunarım.

Dr. Deniz ÖZMEN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
TABLolar LİSTESİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	VII
ÖZET.....	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. TÜYLÜ HÜCRELİ LÖSEMİ.....	5
2.1.1 Tanım	5
2.1.2. Epidemiyoloji.....	5
2.1.3. Etiyoloji.....	6
2.1.4. Tüylü Hücrenin Kökeni.....	6
2.1.5. Klinik ve Laboratuvar Belirtiler.....	8
2.1.6. Tanı	11
2.1.7. Ayırıcı Tanı	12
2.1.8. Tüylü Hücreli Lösemide Tedavi	13
2.2. <i>BRAF</i> GENİ, AKTİVASYON MEKANİZMASI VE <i>BRAF</i> V600E MUTASYONU	20
2.2.1. Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) Sinyal İletim Yolağı.....	21
2.2.2. RAS proteini	22
2.2.3. RAF Kinaz	23
2.2.4. <i>BRAF</i>	23
3. MATERYAL VE METOD	25
3.1. HASTALAR VE TAKİP	25
3.2. METOD	25
3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	25
3.2.2. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini	26
3.2.3. <i>BRAF</i> V600E Mutasyon Analizi	27
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	33
KAYNAKLAR.....	35

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Tüylü Hücreli Lösemi Tanısında Uygulanacak Basamaklar	12
Tablo 2: THL ve diğer yavaş seyirli lenfoid neoplazmlarda immunofenotipleme bulguları.....	13
Tablo 3: PZR Şartları.....	28
Tablo 4: Yeni tanı konan hastalar.....	31
Tablo 5: Remisyonndaki hastalar	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Germinal merkez reaksiyonu: Germinal merkezde somatik hipermutasyon ve izotip değişiminin gerçekleşmesi	7
Şekil 2: May Grünwald - Giemsa boyaması ile periferde tüylü hücrelerin görünümü .	9
Şekil 3: Tüylü hücrenin elektron mikroskop ile görünümü.....	10
Şekil 4: BRAF araştırmalarının kısa tarihi	21
Şekil 5: Mitojenle aktive olan protein kinaz/ekstraselüler sinyalle regüle kinaz yolağı (MEK/ERK).	22

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ABD	: Ana Bilim Dalı
ADA	: Adenozin deaminaz
AID	: Adenozinle aktive olan sitidin deaminaz
ANXA1	: Anneksin A1
BRAF	: V-Raf fare sarkomu viral onkogen homoloğu B1
BCR	: B hücre reseptörü
B-PLL	: B hücreli prolenfositik lösemi
DCK	: Deoksisitidin kinaz
FL	: Foliküler lenfoma
GCSF	: Granülosit koloni - stimülan faktör
GM	: Germinal merkez
GM-CSF	: Granülosit - makrofaj koloni - stimülan faktör
Hb	: Hemoglobin
IL-3	: İnterlökin-3
IL-6	: İnterlökin-6
KLL	: Kronik lenfositik lösemi
MRH	: Minimal rezidüel hastalık
NK	: Natural killer
MAPK	: Mitojenle aktive olmuş protein kinaz
SMZ	: Splenik marjinal tabakası
SMZL	: Splenik marjinal zon lenfoması
THL	: Tüylü hücreli lösemi
THL-v	: THL varyantı
TNF-α	: Tümör nekroz faktör- α
TR	: Tam remisyon
TRAP	: Tartara dirençli asit fosfataz

ÖZET

Tüylü Hücreli Lösemide BRAF V600E Mutasyonunun Araştırılması

Amaç: Tüylü hücreli lösemi (THL) splenomegali, progressif pansitopeni ile seyreden, kemik iliği, dalak ve karaciğerin tüylü görünümlü lösemik B hücreleri ile infiltre olduğu, yavaş seyirli, spesifik immunofenotipik bulgulara sahip ve nadir görülen bir hastalıktır. Yakın zaman dek THL'nin etyolojisi ve patogenezi aydınlatılabilmiş değildi. Birçok solid malignitede pozitif saptanmış olan *BRAF* V600E mutasyonunun THL'de hastalık tanımlayıcı olduğu gösterilmiştir. Serin-treonin RAF kinaz ailesinin bir üyesi olan BRAF proteini RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK) sinyal yolağının bir parçasıdır. Bu sinyal yolağı hücrenin hayatta kalabilmesi, proliferasyonu ve diferansiyasyonunda önemli rol oynamaktadır. THL hastalarında *BRAF* V600E mutasyonunun nihai olarak neoplastik transformasyona yol açacak olan MEK-ERK yolağını aktive ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmamızda yeni tanı konulan ve remisyonda takip edilen THL hastalarında *BRAF* V600E mutasyonunu araştırmayı amaçladık.

Materyal ve Metod: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji Polikliniğinde yeni tanı konulan veya remisyonda takip edilen THL'li 22 hasta ile B hücreli kronik lenfoproliferatif hastalık tanılı 10 sağlıklı hastadan oluşan kontrol grubunda perifer kanında RT-PZR yöntemi ile *BRAF* V600E mutasyonu varlığı araştırıldı.

Bulgular: Kontrol grubundaki hastaların hiçbirinde *BRAF* V600E mutasyonu saptanmadı. Yeni tanı konan ve tedavi öncesi perifer kanı analizi yapılan 10 hastanın 8'inde mutasyon saptandı. Mutasyonun negatif olduğu hastalardan bir tanesi kladribin tedavisi ile remisyona girmede, febril nötropeni tablosu ile kaybedildi. Diğer hasta ise immunfenotipik olarak THL ile uyumlu bulgulara sahip fakat lökositozu olan bir hastaydı. Remisyondaki 12 hastanın dört tanesinde mutasyona saptandı. Bir tanesi takiplerinde nüks etti, başka bir hasta parsiyel remisyondaydı. Mutasyonun pozitif saptandığı, klinik ve laboratuvar olarak tam remisyonda olan iki hastanın moleküler tam remisyonda olmadığı görüldü.

Sonuç: *BRAF* V600E mutasyonun tayini, THL tanısının konmasında yardımcı olabilir, negatif saptanması durumunda THL dışı B hücreli kronik lenfoproliferatif hastalıklara yönelmek gerekir. Remisyondaki hastalarda ise tam moleküler yanıtın araştırılmasında kullanılıp kullanılamayacağı araştırılmayı bekleyen bir konudur.

SUMMARY

Detection of *BRAF* V600E Mutation in Hairy Cell Leukemia

Objective: Hairy cell leukemia (HCL) is an indolent disease with distinct immunophenotypic features which is characterized by pancytopenia, infiltration of bone marrow, spleen and liver with hairy shaped leukemic B-cells. Despite major advances in the diagnosis and treatment of HCL, underlying genetic alterations have not been clearly understood. *BRAF* V600E mutation, detected previously in some malignancies, has been found to be disease-defining in HCL. *BRAF*, a serine-threonine kinase, is a member of RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK) signaling pathway. This pathway is responsible for cell survival, proliferation and differentiation. It has been shown that activating *BRAF* V600E mutation leads to uncontrolled activation of MEK-ERK pathway which leads to neoplastic transformation in HCL. In this study, we aim to take an inventory of HCL patients of who are newly diagnosed or at follow-up after conventional therapies and investigate the presence of *BRAF* V600E mutation in these patients with RT-PCR method.

Material And Method: *BRAF* V600E mutation was analyzed in peripheral blood in 22 patients from Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine, Division of Hematology Outpatient Service and 10 control patients with other B-cell chronic lymphoproliferative diseases.

Findings: AID levels were significantly elevated ($p < 0,05$) in CML patients compared to the control group. No correlations were found between AID levels and disease time, patient gender, age, leukocyte, hemoglobin, platelet, blast, basophil, eosinophil counts at the time of diagnosis, absence and presence of organomegaly, bone marrow fibrosis index, bone marrow cellularity, Sokal score and disease phase. Additionally there was no meaningful correlation between AID levels and tyrosine-kinase-inhibitor (TKI) resistant mutation profile and cytogenetic response during TKI therapy.

Conclusion: Detection of *BRAF* V600E mutation could be helpful for diagnosis of HCL. When the mutation is found negative, other B-cell chronic lymphoproliferative diseases should be considered. Usefulness of investigation of the mutation in treated patient remains an area to be elicited.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüylü hücreli lösemi (THL) splenomegali, progressif pansitopeni ile seyreden, kemik iliği, dalak ve karaciğerin tüylü görünümlü lösemik B hücreleri ile infiltre olduğu, yavaş seyirli, spesifik immunofenotipik bulgulara sahip ve nadir görülen bir hastalıktır (1,2,3). Günümüzde, THL'nin tedavisinde ilk basamakta olarak purin analogları tercih edilmektedir (3).

THL'nin tanı ve tedavisinde kat edilen önemli gelişmelerine rağmen hastalığın altında yatan genetik değişiklikler aydınlatılamamış ve karakteristik bir karyotip anomalisi tanımlanamamıştır. Lösemik tüylü hücrenin moleküler olarak karakterizasyonunun önündeki engeller hastaların çoğunda pansitopeni olması nedeniyle periferden elde edilecek hücre sayısının az olması ve lösemik hücrenin proliferatif hızının düşük olmasıdır.

2011 Haziran'ında yayınlanan bir çalışmada tüylü hücreli lösemili 48 hastanın hepsinde BRAF proteininde 600. pozisyonda nokta "switch" mutasyonu (p.Val600Glu V600E) olduğu saptanmıştır. Bu mutasyon, THL ile ortak klinik ve morfolojik özellikler taşıyan THL varyantı (THL-v) ve splenik marjinal zon lenfoması (SMZL) başta olmak üzere diğer B hücre kaynaklı hematolojik malinitelerde saptanmamıştır (4). V600E mutasyonunun THL'de hastalık tanısında kullanılabileceği ve patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmüştür. Büyük ilgi uyandıran bu çalışma sonrasında yapılan bir dizi araştırmada benzer bulgular saptanmıştır (5,6,7,8).

Serin-treonin RAF kinaz ailesinin bir üyesi olan BRAF proteini RAS-RAF-MAPK sinyal yolağının bir parçasıdır (9). Bu sinyal yolağı hücrenin hayatta kalabilmesi, proliferasyonu ve diferansiyasyonunda önemli rol oynamaktadır. Normal hücrelerde bu yolak büyüme faktörleri, sitokinler, hormonlar gibi hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanan mitojenlerle kontrol edilmektedir. Aktive edici *BRAF* mutasyonları nihai olarak neoplastik transformasyona yol açacak olan MEK-ERK yolağını kontrolsüzce aktifleştirmektedir. Aktive edici *BRAF* mutasyonları arasında en sık rastlanan V600E mutasyonudur (9). Bahsedilen çalışmadan önce somatik-aktive edici *BRAF* mutasyonları malign melanom, papiller tiroid kanseri, kolorektal kanser ve akciğer kanserinde saptanmıştır. BRAF inhibitörleri ile malign melanomlu hastalarında yapılan faz III çalışmaları hastalığın tedavisinde bir çığır açmıştır (10).

BRAF V600E mutasyonunun tüylü hücreli lösemide hastalık tanımlayıcı olduğu art arda yapılan çalışmalarla gösterilmesiyle birlikte *BRAF* inhibitörlerinin tedaviye refrakter veya nüks etmiş hastalarda tedavi seçeneği olabileceği düşünülmüştür. 2012 Mayıs tarihli bir makalede mevcut tedavilere refrakter ağır pansitopenisi olan bir THL vakasında *BRAF* inhibitörü olan vemurafenib ile tam remisyon sağlanmış ve takiplerinde nüks etmediği gösterilmiştir(11).

Bu çalışmada, İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji polikliniğinde yeni tanı konulmuş veya rutin tedaviler sonrası takip edilmekte olan THL hastalarının envanteri çıkarılmış ve bu hastalarda *BRAF* V600E mutasyonunun varlığı araştırılmıştır. Analiz için periferik kan tercih edilmiştir. Klasik bilgiler ışığında tedavi sonrası tam remisyonda kabul edilen hastalar moleküler remisyon açısından değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TÜYLÜ HÜCRELİ LÖSEMİ

2.1.1 Tanım

Tüylü hücreli lösemi (THL), periferik kan, kemik iliği ve dalağın kırmızı pulpasının geniş sitoplazmalı ve küçük tüysü çıkıntılara sahip, küçük olgun B lenfositleri ile infiltrasyonu ile karakterize, nadir görülen kronik B hücreli lenfoproliferatif bir hastalıktır. Bu hastalık genellikle splenomegaliye ve kan hücrelerinin (eritrositler, olgun granülositler ve monositler trombositler) yapımında değişik derecelerde azalmaya neden olur. Olgun hücrelerin azalması ile birlikte malign hücrelerin üretimindeki artış ve splenomegali, anemi, kanama ve enfeksiyonlara eğilim gibi bir çok sistemik sonuca neden olur.

THL, ilk olarak Bouroncle ve arkadaşları tarafından 1958 yılında tanımlanmıştır (1). Schrenl ve Donnely tarafından tüye benzer çıkıntıların görülmesi ile de hastalık THL olarak adlandırılmaya başlanmıştır (12).

Son 25 yılda ilerleme gösteren tedavi seçenekleri ile THL'nin doğal seyri büyük oranda değişiklik göstermiştir. Mevcut ilaçlar ile hastaların büyük bir kısmında tam remisyon (TR) sağlanabilmektedir. Yayınlanan ve çok sayıda hastanın olduğu çalışmalarda sağkalım eğrileri, benzer yaştaki sağlıklı kontrollerle aynı sağkalım eğrilerini göstermektedir. Aynı zamanda, son dönemlerde yapılan çalışmalarla, *BRAF* V600E mutasyonunun hastalık tanımlayıcı olduğunun gösterilmesiyle birlikte hastalık patogenezinin sorumlu moleküler mekanizmalar daha iyi anlaşılmasına başlanmıştır.

Modern tekniklerle, nükleozid analogları ile tedavi sonrasında hastaların önemli bir kısmında minimal rezidüel hastalık (MRH) kaldığı gösterilmiştir. MRH'nin klinik önemi konusunda henüz kesin bir fikir birliğine varılabilmemiş değildir. Yeni nesil tedavilerle (immunoterapi ve *BRAF* inhibitörleri) MRH eradike edilebilecek ve dirençli hastalarda remisyon elde edilebilecektir.

2.1.2. Epidemiyoloji

THL, tüm lenfoid lösemilerin %2'sini teşkil eder. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yılda yaklaşık 600-800 hastaya tanı konulmaktadır (13). Hastalık beyazlarda daha siktir ve erkeklerde 4 kat daha sık görülür (14). Tanı anında ortalama yaş 50'dir (15). İsveç

Kanser Bilgi Bankası'nın verilerine göre hastalık insidansı 1980'lerden beri stabil bir seyir göstermektedir. ABD'de yapılan gözlemsel çalışmalar da benzer bulguları elde edilmiştir. THL daha genç yaş gruplarında da bildirilmiştir, fakat çocuklarda çok nadir görülmektedir (13).

2.1.3. Etiyoloji

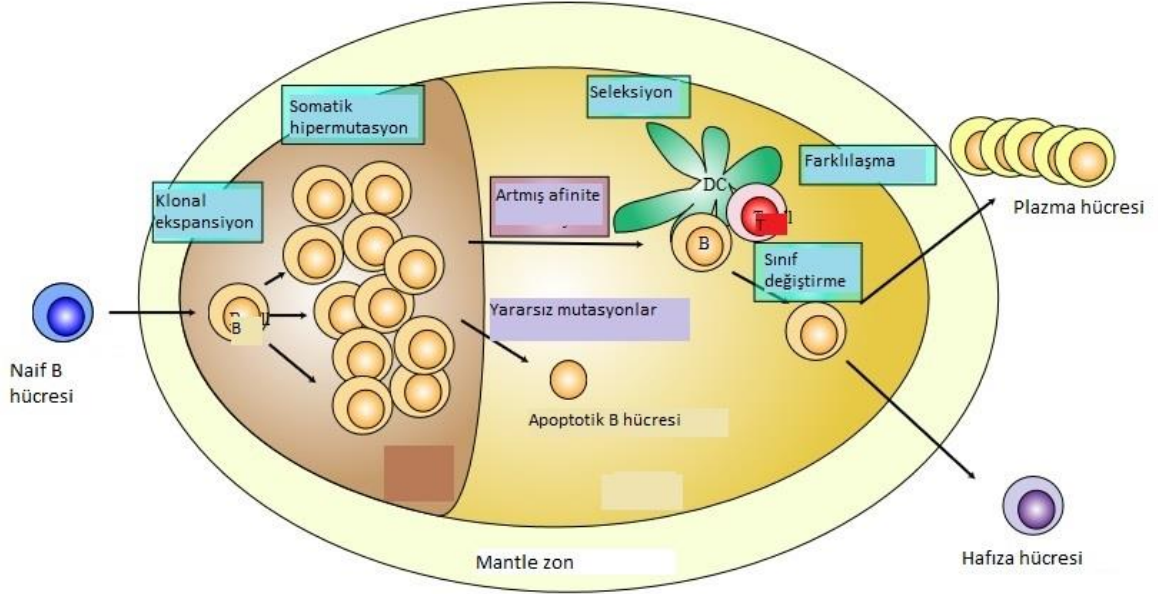
Birçok çalışmada, organik fosfatlı tarım ilaçları, kimyasal çözücüler, radyasyona maruziyet, diğer tarım ilaçları ve Epstein-Barr virüsü ile THL gelişimi arasında ilişki olabileceği belirtilmiş, fakat diğer çalışmalarla bu bulgular deteklenememiş ve THL ile bunlar arasında doğrudan ve nedensel bir bağlantı kurulamamıştır (16). Aynı HLA haplotipini taşıyan aile bireylerinde ailesel THL olguları bildirilmiştir (17).

2.1.4. Tüylü Hücrenin Kökeni

Morfolojik ve fenotipik olarak THL hücresi, B lenfosit ontogenezindeki her hangi bir hücreye benzememektedir. İlk başlarda morfolojik ve fonksiyonel olarak monositlere benzediğinden THL hücrelerinin retiküloendotelyal sistemden kaynaklandığı düşünülmekteydi. Fakat THL hücresinde B hücre reseptörü (BCR), immunoglobulin gen rearranjmanlarının gösterilmesi ile THL'nin B lenfosit kökenli olduğu kanıtlanmış oldu (18).

Olgun bir B lenfosit antijenle karşılaştıktan sonra immunoglobulin değişken bölgelerinde somatik mutasyonlar meydana gelir. İmmunoglobulin değişken bölgelerinin DNA dizi analizinde lenfoid malignitenin kaynak aldığı hücrenin lenfosit ontogenezinin hnağı aşamasından kaynaklandığı anlaşılır (Şekil 1). Somatik hipermutasyon lenf folliküllerinin germinal merkezinde gerçekleşir ve ardından izotip değişimi meydana gelir. Aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz (AID) her ikisi için de gerekli bir enzimdir. İmmunoglobulinin değişken bölgelerinin genetik analizi, klonal hücrenin somatik mutasyon ve izotip değişimi geçirip geçirmediğini gösterir. Yapılan bir çok çalışma ile THL hastalarının %85'inden fazlasında, malign hücrelerin immunoglobulin değişken bölge genlerinde somatik hipermutasyonun meydana geldiği ve farklı immunoglobulin sınıfları ve izotipleri eksprese ettiği gösterilmiştir (24). Ayrıca, THL hücresi her iki basamak için de gerek olan AID enzimini eksprese etmektedir (19). Bu bulgular THL hücresinin periferik lenfoid dokuda germinal merkez reaksiyonundan geçmiş bir hücre olduğunu göstermektedir. Olguların yaklaşık %40'ında, lösemik hücreler IgG3 ağırlıklı olmak üzere çeşitli immunoglobulin ağır zincir izotipleri eksprese etmektedirler. Ancak sadece tek bir hafif zincir taşımaktadırlar. Bütün bu bulgular tüylü hücreli lösemide hücrelerin izotip değişimi sonrasında germinal

merkezden ayrılmada aşamasında bir duraklama olabileceğini düşündürmektedir (19). Lösemik hücrenin GM sonrasına ait olduğunu düşündüren güçlü kanıtlar da mevcuttur (24).



Şekil 1: Germinal merkez reaksiyonu: Germinal merkezde somatik hipermutasyon ve izotip değişiminin gerçekleşmesi

http://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AGerminal_center.svg kaynağından değiştirilerek alınmıştır (20).

Bir çalışmada, klasik THL hastalarının %83'ünde hücrelerin GM-sonrası döneme ait ağır zincir değişken bölgede mutasyon taşıyan hücreler olduğu kanıtlanmıştır (18, 21). Ayrıca antijen bağımlı bir sürecin olduğuna dair kanıtlar edinilmiştir.

Malign lenfoid hücreler ve normal B hücrelerinin gen ekspresyon profillerinin belirlenmesiyle tüylü hücrelerin postGM kökenli olduğu anlaşılmıştır. Tüylü hücrenin, diğer B hücre kökenli lenfoid malignitelerden farklı olarak, postGM döneme ait hafıza hücrelerinden kaynaklandığını gösterilmiştir (22). THL hücrelerinin normal hafıza hücrelerindeki çoğalma, apoptoz ve DNA metabolizma özelliklerini koruduğu, ancak hücre adhezyonu ve kemokin reseptörlerini kontrol eden genlerin ekspresyonunda belirgin farklılıklar gösterdiği görülmüştür. Hafıza hücrelerinden farklı olarak tüylü hücreler normal hafıza hücrelerinin taşıdığı CD27 molekülünün ekspresse etmezler. Ancak CD27 negatif normal hafıza hücreleri de bildirilmiştir ve neoplastik transformasyon sürecinde tüylü hücrenin CD27 molekülünü kaybetmesi mümkündür (22).

THL'de lenf nodu tutulumu nadir olarak görüldüğünden, hastalığın dalak ve karaciğerden köken aldığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar tüylü hücrenin, dalağın splenik marjinal tabakasına (SMZ) ait olduğunu düşündürmektedir. Normal SMZ hücreleri B lenfosit hafıza hücreleridir. Yapılan bir genetik analiz çalışmasında, tüylü hücrenin, kırmızı pulpanın sinuzoidal hücrelerine ve beyaz pulpanın marjinal zon hücrelerine benzer biçimde dalağa spesifik antijenler eksprese ettiği gösterilmiştir (22).

2.1.4.1. *BRAF* V600E Mutasyonu

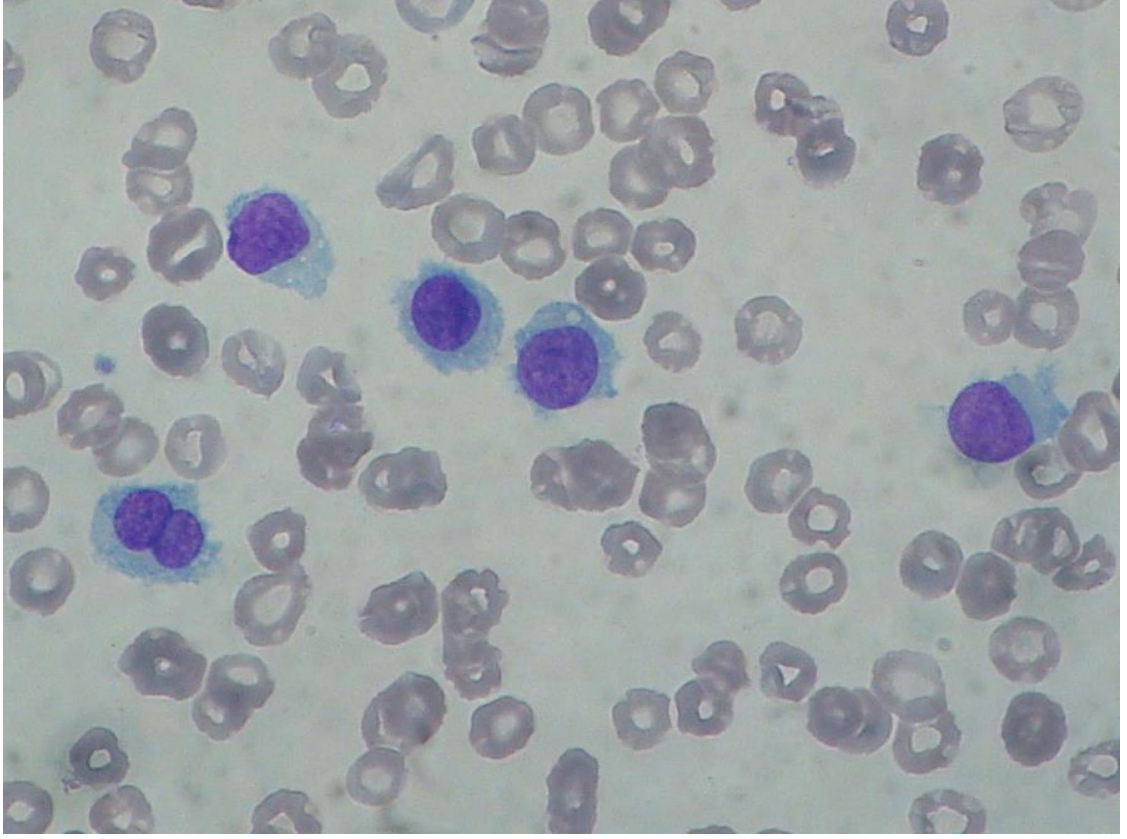
Tiacci ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışmada, tüm genom analizi yöntemi ile bir hastada *BRAF* V600E mutasyonu tespit edildikten sonra, bu mutasyon ardından incelenen 46 hastada da gösterilmiştir (4). Diğer B hücre malignitelerinde ise bu mutasyon saptanmamıştır. Ardından yapılan bir çok çalışmada THL'de V600E mutasyonunun olduğunu gösterilmiştir (7, 8, 25, 26, 27). Tüylü hücrede, RAF-MEK-ERK mitojenle aktive olmuş protein kinaz (MAPK) yolağının aktiflendiği, yolda RAF'tan sonra gelen MEK ve ERK'in fosforillendirildiği gösterilerek kanıtlanmıştır (23). *BRAF* inhibitörü tedavisi ile remisyona elde edilmesi bu yolağın THL gelişimi ve proliferasyonunda önemli bir rol oynadığını kanıtlamaktadır (11). *BRAF* V600E mutasyonu THL'de hastalık tanımlayıcı bir mutasyon olarak kabul edilmiştir. Başka çalışmalar, *BRAF* V600E mutasyonunun Erdheim-Chester hastalığının belli bir alt grubunda, Langerhans hücreli histiyositozların tümünde, sınıflanmamış B hücreli lenfoma/lösemide, malign melanom ve kolonun adenokarsinomu gibi solid tümörlerde de bulunduğunu göstermiştir (28, 29, 30).

2.1.5. Klinik ve Laboratuvar Belirtiler

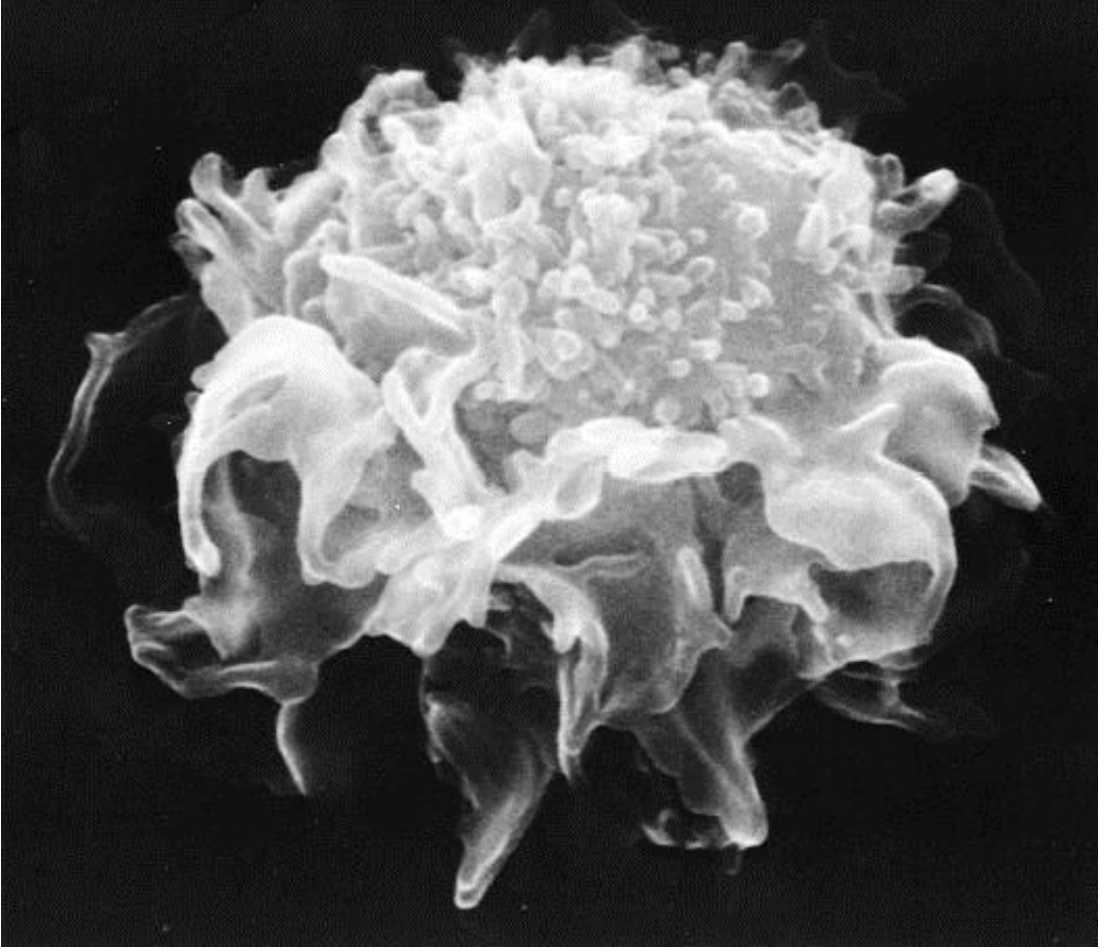
Tipik olarak, hastaların büyük bir kısmı pansitopeni ve splenomegali ile başvurur. Bunlara halsizlik, yorgunluk, ateş, sol üst kadranda dolgunluk hissi/acı, tekrarlayan enfeksiyonlar veya kanama eşlik edebilir. Hastaların %85'inde anemi, %60-80'inde trombositopeni ve %60'ında lökopeni saptanır. Sitopeniler hayatı tehdit edecek düzeyde ağır olabilir; hipersplenizm ve kemik iliği infiltrasyonuna bağlıdır. Monositopeni karakteristik bir bulgudur. Yaklaşık %10 hasta lökositoz ile prezente olur ve periferde dolaşan hücrelerin büyük kısmı tüylü hücrelerdir. Hastaların yaklaşık dörtte biri asemptomatiktir. Rastlantısal olarak saptanan sitopeni veya splenomegali ile tanı konur.

Periferde tüylü hücreye seyrek rastlanır. Tüylü hücreler homojen kromatin içeren, fasulye veya oval biçimde çekirdeğe sahip, olgun bir lenfosit ile aynı boyutlarda lenfositlerdir

(3). Nukleolus genellikle görülmez. Sitoplazma açık mavi renkte, bol miktardadır ve kabarık bir görüntüye sahiptir (Şekil 2). Hücre membranında düzensiz tüysü çıkıntılar vardır ve en iyi faz kontrast mikroskopunda görülür. Elektron mikroskopunda hücrelerin yüzeyinde birçok kıvrım ve mikrovilli saptanması THL için tipik bir bulgudur (Şekil 3).



Şekil 2: May Grünwald - Giemsa boyaması ile periferde tüylü hücrelerin görünümü (68).



Şekil 3: Tüylü hücrenin elektron mikroskop ile görünümü (68).

Kemik iliği aspirasyonu çoğu zaman yapılamaz (dry-tap). Kemik iliği infiltrasyonu interstisyel veya yama tarzında olabilir. İnfiltratın görünümü sitoplazmanın bol oluşu ve hücre nükleuslarının birbirinden ayrı durması nedeniyle “sahanda yumurta”ya benzetilmiştir (3). Zamanla, kemik iliğinde retikülün fibrozis artışı ve hematopoetik hücrelerin azalması “dry tap” gelişmesine yol açar. Kemik iliği fibrozisi; tüylü hücreler tarafından fibronektin matriks ve fibroblastlar tarafından çoğunlukla tip III kollajen fibrillerinden oluşan ince retikülün liflerin üretimine bağlıdır (32). Tüylü hücreler asit fosfataz izoenzim 5 eksprese ederler ve bu enzim tartarik aside dirençlidir. Bu özelliği sayesinde bütün vakalar tartara - dirençli asit fosfataz (TRAP) ile pozitif olarak boyanırlar (16). İmmunhistokimyasal olarak TRAP ile pozitif boyanma tanıya varmada yüksek oranda spesifite gösterir. Ayrıca; anneksin A1 (ANXA1) ile boyanma THL'yi varyant formundan ve SMZL'den ayırmada yardımcıdır (31). Fakat ANXA1 pozitifliği; myeloid hücreler ve T lenfositlerde de pozitif saptanabileceğinden diğer B hücre belirteçleri ile verifiye edilmelidir. Hücreler genellikle siklin D1 ile pozitif olarak boyanırlar. Hastaların belli bir bölümünde hiposelülerite yanlılıkla aplastik anemi

tanısı koyulmasına yol açabilir. CD20 gibi antijenlerle boyanma, anormal B lenfosit infiltrasyonun göstererek tanıda yardımcı olur (3).

THL hücreleri flow sitometride karakteristik immunofenotipik özelliklere sahiptir. Hepsi CD45 (ortak lökosit antijeni) eksprese ederler. Olgun B lenfosit profili gösterirler, bir veya daha fazla ağır zincir ve monotipik hafif zincir eksprese ederler. CD19, CD20, CD22 ve FMC7 gibi B hücre antijenlerini eksprese ederler, fakat CD5, CD10 (vakaların%10'unda pozitif olabilir) ve CD23 (%20'de pozitif olabilir) taşımazlar. THL'yi diğer B hücreli malignitelerden ayırt edecek bir belirteç yoktur fakat CD11c, CD103, CD123 ve CD25 (IL-2 reseptörü alfa-subuniti) THL'de karakteristik olarak eksprese olurlar. CD22 ve CD20 kuvvetli olarak eksprese olmaktadır. Bu tedavi seçeneklerini arttırmaktadır.(33).

Splenomegali, hastaların büyük bir çoğunluğunda bulunur ve %20 hastada massif boyutlara ulaşabilir. Dalak tutulumu kırmızı pulpada kordonların ve sinüslerinin tüylü hücrelerle diffüz infiltrasyonu ve beyaz pulpanının atrofisi ile karakterizedir. Mikroskopide, tüylü hücrelerle döşeli içi kan dolu sinüslerin görünümü, *psödösiniüs* ya da *kırmızı kan gölü* olarak adlandırılır (3). Lenfadenomegali nadir olarak saptanır, hastalığın sadece ileri aşamalarında görülebilir. Tutulum genelde abdominal ve retroperitoneal alana sınırlı kalır. İnfiltrasyon interfoliküler ve parakortikal alanlarda olup kapsüle doğru yayılım görülebilir. Hepatomegali de nadir olarak saptanır ve hastaların üçte birinde görülür. Hemen hemen her hastada sinüzoidlerin ve portal alanların infiltre olmasına rağmen hepatomegali saptanmamaktadır. Hastalar, mediastinal, paravertebral kütle, iskelet sisteminde litik lezyonlar, plevra effüzyonu ve assit, deri, göz, santral sinir sistemi, gastrointestinal sistem tutulumu gibi nadir tablolar ile de prezente olabilir (16, 36). Ayrıca THL'de infeksiyonlara yatkınlık olduğu vardır (16). THL, PAN, vaskülit, RA gibi otoimmün bozukluklar ile de kendini gösterebilir (34, 35).

2.1.6. Tanı

THL'den genellikle periferde büyük sitoplazmalı tüylü hücrelerin görülmesi ile şüphelenilir. Kemik iliği aspirasyon biyopsisi ve eş zamanlı akım sitometrisi ile yapılan immunofenotipleme ile tanı konulur. Aspirasyon aşırı fibrozis nedeniyle başarısız olabilir ("dry-tap"). Massif splenomegali sebebiyle yapılan splenektomilerde de tanı konabilir. Tüylü hücreler B hücre antijenleri (CD19, CD20, CD22 vb.) ile beraber CD103, CD11c ve CD25 eksprese ederler. B lenfositlerde ANXA1 ekspresyonu spesifik, fakat THL tanısı için sensitif

değildir. Tanıda zorluk yaşanan vakalarda BRAF V600E mutasyonu araştırılması düşünülebilir (Tablo 1).

Tablo 1: Tüylü Hücreli Lösemi Tanısında Uygulanacak Basamaklar

Hikaye ve fizik muayene
Tam kan sayımı ve lökosit formülü
Periferik yayma değerlendirilmesi
Biyokimyasal tetkikler
Kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi (immunboyamalar dahil)
Kemik iliği ve periferik kanın flow sitometrik analizi
Gerekli görüntülemeler, ateş varlığında enfeksiyonun dışlanması
<i>BRAF</i> V600E mutasyonu tayini (gerekli görülürse)

2.1.7. Ayırıcı Tanı

THL tanısında, başta variant tip THL (THL-v) ve SMZL başta olmak üzere yavaş seyirli kronik lenfoproliferatif hastalıklardan ayırım yapmak önemlidir. THL-v tüm vakaların %10'unu teşkil eder ve ortalama görülme yaşı 71'dir. Hastalarda çoğunlukla lökositoz mevcuttur ($>10.000/\text{mm}^3$), tüylü hücreler prolenfositik özellik taşır, monositopeni görülmez (38). Splenomegali ve sitopeniler hastaların büyük bir kısmında mevcuttur; kemik iliği ve dalak tutulumu THL ile aynıdır. İmmunfenotiplemede THL-v'de CD25 ve CD123 ekspresyonu saptanmaz (Tablo 2). Translokasyonlar da dahil olmak üzere bazı kromozomal anormallikler bildirilmiştir (26). THL-v'nin klasik THL'den en önemli farkı klasik tedavilere dirençli olmasıdır. Önceleri THL'nin bir alt tipi olarak kabul edilen THL-v'yi ayrı bir hastalık olarak kabul etmek gerekir (26, 27, 37). THL ve THL-v'nin farklı immunoglobulin ağır zincir repertuarları ve somatik hipermutasyon profilleri mevcuttur. İkisinin ayırımında THL'de AID ekspresyon düzeyinin artması önemlidir. ANXA1 sadece THL'de pozitifdir. THL'de hastalık tanımlayıcı bir mutasyon olan *BRAF* V600E, THL-v ve SMZL'de negatiftir (26).

SMZL, THL ile benzer klinik ve morfolojik özellikler gösterebilir, fakat TRAP ekspresyonu görülmez; CD25 ve CD103 antijenleri yoktur. Histokimyasal olarak ANXA1 negatif olarak boyanır. SMZL'de dalağın hem kırmızı, hem beyaz pulpası infiltre olur. Şeffaf sitoplazmalı hücreler nedeniyle marjinal zon ekspansiyon olarak görünür. THL'nin aksine kemik iliğinde nodüler infiltrasyon yapar (3). İmmunofenotipik olarak CD103, CD11c ve CD25

negatiftir. Zor vakalarda kemik iliği, dalak ve lenf nodunun birlikte değerlendirilmesi gerekebilir. SMZL’da ayrıca monositik antijenler pozitifdir ve hücreler morfolojik olarak monositlere benzerler.

Kronik lenfositik lösemi (KLL), B hücreli prolenfositik lösemi (B-PLL) ve foliküler lenfoma (FL) gibi yavaş seyirli kronik lenfoproliferatif hastalıklardan karakteristik morfolojik ve immunotipik bulgular yardımıyla ayırım yapılabilir (Tablo 2). Ayırıcı tanıda düşünülebilecek diğer hastalıklar aplastik anemi, primer miyelofibroz ve sistemik mast hücre hastalıklarıdır (16).

Tablo 2: THL ve diğer yavaş seyirli lenfoid neoplazmlarda immunofenotipleme bulguları (16).

Hastalık	sIg	CD5	CD10	CD11c	CD20	CD22	CD23	CD25	CD103
THL	+/-	-/+	-	++	+	+	-/+	+	++
KLL	+/-	++	-	-/+	-/+	-/+	++	-/+	-
B-PLL	++	+	-	-/+	+	+	+/-	-	-
THL-v	+/-	-	-	++	+	+	-	-	-/+
MCL	+	++	-	-	+	+	-	-	-
SMZL	+	-/+	-/+	+	+/-	+/-	-	-	-
FL	+	-	+	-	+	+	-	-	-

2.1.8. Tüylü Hücreli Lösemide Tedavi

2.1.8.1. Tedavi Endikasyonları

Birçok THL hastası asemptomatiktir ve tanı kesinleştikten sonra tedavi edilmeksizin uzun süre takip edilebilirler. Erken tedavinin faydasının olduğu kanıtlanamamıştır. Aşağıda belirtilen şikayet ya da bulguların gelişmesi durumunda tedavi endikedir (39).

- Sitopeniler: Mutlak nötrofil sayısının $<1.500/\mu\text{L}$, Hb değerinin <11 g/dL veya trombosit değerinin $<100.000/\text{mikroL}$ oluşu
- Semptomatik splenomegali veya semptomatik lenfadenomegali (sık olarak saptanmaz)
- Konstitüsyonel semptomlar (ateş, gece terlemesi, yorgunluk, halsizlik, kilo kaybı vb.)

THL tanısı konulmuş 233 hastanın takip edildiği bir çalışmada, purin analogları ile tedavi başlangıcında Hb değeri 10 g/dL, trombosit değeri 100.000/mikroL altında olan hastalarda progresyonsuz sağkalım sürelerinin daha kısa olduğu görülmüştür (9 vs. +20 yıl) (41).

2.1.8.2. Tedavi Tarihçesi

Son 25 yılda THL tedavisinde önemli gelişmeler yaşanmıştır; sağkalım eğrileri aynı yaş grubundaki sağlam kontrollerle benzer sonuçlar göstermektedir. İnterferon- α (IFN- α) kullanılmadan önce splenektomi yaygın olarak kullanılmaktaydı. Splenektomi, kemik iliğinde morfolojik remisyona neden olmadığı halde, periferik kan tablosunu %70 hastada düzeltmekteydi fakat ilk beş yıl içinde %45 hastada progresyon görülmekteydi. Ameliyatın getirdiği ilave morbidite ve mortalite düşünülecek olursa, seçilmiş vakalar dışında splenektomi şu anda uygulanmamaktadır.

İlk kez 1980 yılında interferon- α (3 milyon ünite s.c., 3 haftada bir) ile yapılan bir çalışmada tam ve kısmi remisyon olguları bildirilmiştir (16). Ardından yapılan çalışmalarla, TR oranları %4-30, kısmi remisyon oranları %43-86 olarak bildirilmiştir, fakat TR'de kabul edilen hastaların kemik iliği örnekleri dikkatlice incelendiğinde rezidüel tüylü hücreler saptanmıştır. Genel kabul gören kullanımı, 12-18 hafta boyunca, 3 haftada bir 2 milyon ünite s.c. uygulanması şeklindedir. İnterferon- α sonrası düzelen hastaların çoğunun nüks ettiği görülmüştür. Fakat 10 yıllık takip süresince, hayatta kalan bazı hastalarda tedavi ihtiyacı ortaya çıkmadığı görülmüştür.

İnterferon- α 'nın THL üzerindeki etkisi bilinmemektedir; granülosit koloni-stimülan faktör (GCSF), granülosit-makrofaj koloni-stimülan faktör (GM-CSF), interlökin-3 (IL-3) ve interlökin-6 (IL-6) düzeylerinin azalmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca interferon- α 'nın tümör nekroz faktör- α (TNF- α) yoluyla tüylü hücre apoptozuna yola açtığı öne sürülmüştür (16).

İnterferon- α ile tedavi sonrası, grip benzeri tablo, bitkinlik, anoreksi, bulantı, kusma, ishal, deri döküntüsü, periferik nöropati ve depresyon gibi yan etkiler görülebilir. Purin analoglarının kullanıma geçmesi ile beraber interferon- α ; purin analoglarına dirençli hastalar veya ağır sitopenileri olan hastalarda purin analogu ile tedavi öncesinde lökopeniyi düzelterip infeksiyöz komplikasyonlarını azaltmak amacıyla verilebilir (51).

2.1.8.3. İlk Basamak Tedavi

Semptomatik THL hastalarında purin analogları, kladribin ve pentostatin ilk basamak tedavi olarak tercih edilir. Uygulama kolaylığı nedeniyle, bir siklus kladribin tedavisi en uygun seçenektir

2.1.8.3.1. Purin Analogları

Purin analogları; pentostatin (2'-deoksikoformisin, 2'-DCF) ve kladribin (2-klorodeoksiadenozin, 2-CdA) lenfositleri hedef alır ve hem istirahat hem bölünme halindeki hücrelere sitotoksik etki gösterir. Her ikisi de THL hastalarının büyük bir kısmında TR sağlar. Hastalarda, daha önce tedavi görsün ya da görmesin, tümör yükünden bağımsız olarak, her iki ilaçla benzer oranda TR sağlanır (41, 42). Diğer bir purin analogu olan fludarabinin incelendiği büyük vaka serileri yoktur. Yeni yapılan çalışmalar, purin analoglarının ritüksimab gibi monoklonal antikorlarla güvenli bir şekilde kombine edilebileceklerini göstermektedir ve bu kombinasyonla daha yüksek remisyon oranlarına ulaşmaktadır. Yanıtın yeterli olmaması veya nüksün ilk 12 ay içinde ortaya çıkması durumunda kombine tedaviler düşünülebilir(43).

Kladribin

Daha önce tedavi görmemiş THL hastalarında birçok merkezde tercih edilen ilk tedavi kladribindir. Pentostatinden farklı olarak, kladribin adenozin deaminaz (ADA) tarafından deaminasyona dirençlidir. Kladribin, deoksisitidin kinaz (DCK) tarafından fosforile edilir. Esas toksik etkiyi gösteren fosforile şeklidir. DCK lenfositlerde bol bulunan bir enzimdir ve oluşan yeni molekül 2-klorodeoksiadenozin trifosfat, bölünen ve bölünmeyen hücrelere sitotoksik etki gösterir. Bölünen hücrelerde, kladribin ribonükleotid redüktaz enzimini inhibe eder ve dATP ile DNA sentezi aşamasında yarışmaya girer. Oluşan lenfotoksik etki konjenital ADA enzimi eksikliğine benzer bir tablo oluşturur (44).

Standart tedavi rejimi yedi gün süreyle sürekli intravenöz infüzyon uygulaması şeklindedir (0.10 mg/kg/gün) (45, 46). Alternatif rejimler; 5 gün- 2 saatlik (0.14 mg/kg/gün), haftalık 2 saatlik infüzyonlar, subkutan ve oral uygulamalardır (47).

Vaka serileri ve retrospektif analizler kladribin ile hastaların büyük bir kısmında tam remisyon sağlandığını göstermiştir:

- Kladribinin, THL'de etkili olduğu ilk olarak 1990 yılında gösterilmiştir (45). 20 hastanın 11'inde tek siklus (0.10 mg/kg/gün, 7 gün boyunca devamlı infuzyon) tedavi sonrası sekiz hafta içinde remisyon sağlanmıştır. 16 haftalık ortalama takip süresi içinde hastaların hiçbiri nüks etmemiştir.
- THL'de kladribin tedavisinin incelendiği 861 hastayı içeren en büyük vaka serisinde tam remisyon oranı %50'dir. Dört yıllık hastalıksız sağ kalım oranı ise %84 olarak saptanmıştır (48).
- Kladribin ile yapılmış 349 hastalık en büyük tek merkezli çalışmada (0.10 mg/kg/gün, 7 gün boyunca devamlı infuzyon) tam ve kısmi remisyon oranları %91 ve %7 olarak saptanmıştır. Dört yıl içinde ortalama sağkalım %96, tam ve kısmi remisyona giren hastalar için nüks oranları %16 ve %54 olarak saptanmıştır. Nüks etmiş 53 hastada kladribinle ikinci kez tedavi sonrası tam ve kısmi remisyon oranları %62 ve %26 olarak bulunmuştur (49).

Kladribin ile tedavi sonrasında, tüylü hücre ve nötrofil sayılarındaki düşme ile birlikte hastaların yaklaşık %40'ında ateş görülür (50). Bazı vaka serilerinde de tedavi ardından herhangi bir viral, fungal ya da oportunistik infeksiyon bildirilmemiştir. Ateş tüylü hücrelerden salınan sitokinlere bağlı olarak gelişebilir.

Kladribin tedavisi sonrası gelişen ateş ve nötropeni ilişkisini araştıran bir çalışmada; granülosit koloni-stimülan faktör (5 mcg/kg/gün sc -3, -2, ve -1, kladribin bittikten sonra tekrarlanması şeklinde) uygulamasının nötropeni süresini kısalttığı, fakat ateşli hasta, ateşli gün sayısı ve antibiyotik tedavisi için hastane başvuru sıklığını azaltmadığı görülmüştür (50).

Kladribin alan hastalarda kontrol için yapılan kemik iliği biyopsi örneklerinde hipoplazik ve aplazik alanlarının görülebilir. Bu alanlar, tam remisyona girmiş, tam kan sayımları normal olan hastalarda görülür ve klinik önemi bilinmemektedir.

Pentostatin

Pentostatin, THL'de yüksek remisyon oranlarının bildirildiği ilk ajandır (52). ADA enzimini irreversibl olarak inhibe eder, ve biriken deoksiadenozin trifosfat moleküllerinin sitotoksiteden sorumlu olduğu düşünülmektedir. THL için FDA tarafından önerilen tedavi şeması maksimal cevaba ulaşana kadar iki haftada bir 4 mg/m² şeklinde uygulamadır.

Pentostatini değişik doz ve şemalarla uygulayan şalışmalar yapılmıştır. Bunlardan birinde pentostatin 5 mg/m² haftada iki gün, 2 haftada bir tekrarlanacak şekilde uygulanmıştır (4-15 doz). TR oranı %64 saptanmıştır, ve hastaların büyük bir kısmında ilk altı hafta içinde maksimal cevaba ulaşılmıştır (52). Yan etki olarak bulantı, kusma, deri döküntüsü, konjonktivit ve nörolojik toksisite gözlemlenmiştir. Hastaların %70'inde hayatı tehdit eden nötropeni görülmüş, bu durum tedavinin ilk 3 siklusunda ortaya çıkmıştır. Altı hasta ise infeksiyonlar sonucu ölmüştür (53).

Diğer şalışmacılar, daha düşük pentostatin dozları kullanarak, daha hafif yan etki profili ile benzer sonuçlara ulaşmışlardır. İki haftada bir 4 mg/m² dozundan tedavi alan hastalarda %87 oranında TR sağlanmıştır; infeksiyon oranı daha düşük olarak saptanmış, mortalite ise görülmemiştir. CD4 pozitif hücre düzeyleri geçici bir süre için belirgin biçimde d ş m ş, fakat iki yıllık takip s resinde fırsatçı infeksiyon ya da sekonder malignite gözlemlenmemiştir (54).

Pentostatin (4 mg/m² IV 2 haftada bir, 6 hafta boyunca) ve IFN- 'nın (3 milyon  nitesc, haftada üç kez) karşılaştırıldığı bir şalışmada TR oranları %76 ve %11 olarak saptanmıştır. TR sağlanan pentostatin alan hastalarında genel ve n kss z sağkalım oranları %87 ve %76 olarak bulunmuştur. Pentostatinle TR prediktörleri, yüksek hemogloblin konsantrasyonu, erken yaş ve splenomegali olmamasıdır. Hastaların ortalama dokuz yıllık takibinde, %83 hastanın hala hayatta olduğu ve TR sağlanan hastaların %18'inin nüks ettiği görülmüştür. Dokuz yıllık takipte görülen 40 ölümün sadece 3 tanesi THL ile ilişkilidir, ve mortalite riskinde istatistiksel olarak artış saptanmamıştır (55).

Tam Remisyonun Tanımı

K r sağlanmasa da, semptomların bulunmaması, fizik muayenede organomegalinin ortadan kalkışı ve Hb>12 g/dL, trombosit> 100 x 10⁹/L, nötrofil> 1.5x 10⁹/L olması, THL hücrelerinin periferik kan ve kemik iliğinde morfolojik olarak tespit edilememesi tam remisyon olarak kabul edilmektedir.

Purin Anal ğunun Seçimi

Önceden tedavi görmüş ya da görmemiş THL hastalarının büyük bir kısmı hem tek sikl s kladribin, hem de birkaç siklus pentostatin ile remisyona girer (39). Ortalama 16 yıl süreyle 233 hastanın izlendiği bir şalışmada; kladribin ve pentostatinle sağlanan cevap oranları %100 ve %96, TR oranları %76 ve %82, 10 yıllık sağkalım %100 ve %92'dir (41).

Tam remisyon sağlanan hastalarda sağkalım süresi parsiyel remisyondakilere göre önemli derecede daha uzundur (14 vs. 5.5 yıl).

Kladribin ve pentostatinle sağlanan benzer olumlu sonuçlara rağmen, kullanımın kolaylığı ve yan etkilerinin daha hafif oluşu nedeniyle kladribin ilk basamak tedavide daha çok tercih edilmektedir. Hangi ajanla daha az sekonder malignite riski geliştiğı ise bilinmemektedir.

Yan Etkiler

Her iki purin analogu da uzun süreli immunosupresyona neden olurlar. Pentostatin, T hücre sayısını B ve natural killer (NK) hücelere göre daha fazla düşürür. Mutlak CD4+ ve CD8+ hücrelerin sayısı 200/mikroL'nin altına kadar düşer, ve düşüklük pentostatin kesildikten sonra altı aya kadar devam eder. CD4+ hücrelerin normal değerlerine pentostatinden sonra ortalama 54 haftada, kladribinden sonra 40 haftada döndüğünü saptamıştır (56, 57).

Tedavi ile ağır bir immunosupresyon oluşmasına rağmen, tek tük görülen herpes zoster infeksiyonları dışında fırsatçı infeksiyonlara pek rastlanmaz. Başka bir endikasyonla ek olarak steroid kullanan hastalara, Pneumocystis carinii pnömonisi profilaksisi verilmesi düşünülebilir (33, 39).

2.1.8.3.2. Tedavi Sonrası Rezidüel Hastalık

Purin analogları ile başarılı sonuçlara ulaşılmasının ardından, kontrol kemik iliğı biyopsileri ile MRH varlığı araştırılmıştır. MRH anti-CD20 boyaması ile saptanabilir. Bu yöntemle dayanılarak remisyonadaki hastaların %13-53'ünde rezidüel hastalık saptanmıştır. Fakat bu durumun nükse yol açıp açmadığı bilinmemektedir (58). Polimeraz zincir reaksiyonu ile yapılan incelemelerle, morfolojik ve hatta akım sitometrik çalışmalarla remisyonunda kabul edilen hastalarda malign klon hücrelerinin bulunduğu gösterilmiştir. Rituksimab ve kladribinin kombine edildiğı hastaların bir kısmında rezidüel hastalığın eradike edildiğı görülmüştür fakat bu stratejinin uzun dönemde hastalıksız sağkalıma etki edip etmediğı bilinmemektedir (59).

2.1.8.4. Dirençli veya Nüksetmiş Hastalığın Tedavisi

2.1.8.4.1. Dirençli Hastalık

Tedavi gören THL hastaların yaklaşık %4'ü tedavilerden yarar görmemekte ve %20'ye yakın bir oranında da sadece parsiyel remisyona ulaşabilmektedir. Bu vakalar için, diğer purin analoguna geçiş, IFN- α , splenektomi ya da B hücre antijenlerine yönelik monoklonal otoantikorların purin analogları ile kombinasyonu gibi tedavi seçenekleri düşünülebilir (41, 42, 51).

2.1.8.4.2. THL-varyantı

THL-v vakaları standart tedavi rejimlerine dirençlidir. Bu hastalarda veriler kısıtlı olmakla beraber, monoklonal antikorlar (alemtuzumab, rituksimab, BL-22 v.b.) denenebilir (27, 38).

2.1.8.4.3. Nüks Etmiş Hastalık

Ortalama 12.5 yıllık gözlem süresine sahip bir çalışmada purin analogları ile tedavi sonrası nüks oranları kladribin ve pentostatin ile %48 ve 42 olarak hesaplanmıştır (42). Nüks etmiş THL hastalarında, purin analogları ile ikinci bir siklus ile tedavi önerilir. Hastaların %70'inde tam remisyona ulaşılır (39, 41, 42, 46, 49, 55). İkinci ya da üçüncü kez tedavilerle cevap oranları %97-100'lere kadar yükselse bile, TR oranları ve hastalıksız sağ kalım süreleri her tedavi siklusu ile giderek azalmaktadır (41)

2.1.8.4.4. Monoklonal Antikorlar

Ortalama 12.5 yıllık gözlem süresince hastaların takip edildiği bir çalışmada purin analogları ile tedavi sonrası nüks oranları kladribin ile %48 ve pentostatin ile %42 olarak bulunmuştur (42). Nüks etmiş THL hastalarında, aynı purin analogu ile ikinci bir tedavi önerilir. Hastaların %70'inde tam remisyona ulaşılır (39, 41, 42, 46, 49, 55). İkinci ya da üçüncü kez tedavilerle cevap oranları %97-100'lere kadar yükselse bile, her tedavi siklusu ile TR oranları ve hastalıksız sağ kalım süreleri giderek azalmaktadır (41)

2.1.8.5. Klinik Çalışmalar

THL tedavisi için birçok ajan şu an denemekte ve üretilmektedir. Daha önce *BRAF* mutasyonu pozitif saptanan solid tümörlerde kullanılan *BRAF* inhibitörü vemurafenib; *BRAF* mutasyonu saptandıktan sonra 2012 ve 2013 yıllarında tedaviye refrakter hastalar üzerinde günlük infuzyonlar şeklinde uygulanmış, hastalıkta remisyona ulaşmıştır. Vemurafenib ile

toplam tedavi süresi 53 ve 51 gün sürmüştür. Tedavinin bitiminin ikinci ayında kemik iliğinde tüylü hücrelerde göreceli artış gözlemlenmiş fakat sitopeni gelişene dek tedavi verilmemesi planlanmıştır. Tedavi kesilmesine yol açacak yan etki görülmemiştir. BRAF inhibitörleri ile tedavide uzun vadeli sonuçlar ve yan etki profilinin araştırılması için başka klinik çalışmalara ihtiyaç vardır (11,63).

2.1.8.6. Sekonder Malignite Gelişimi

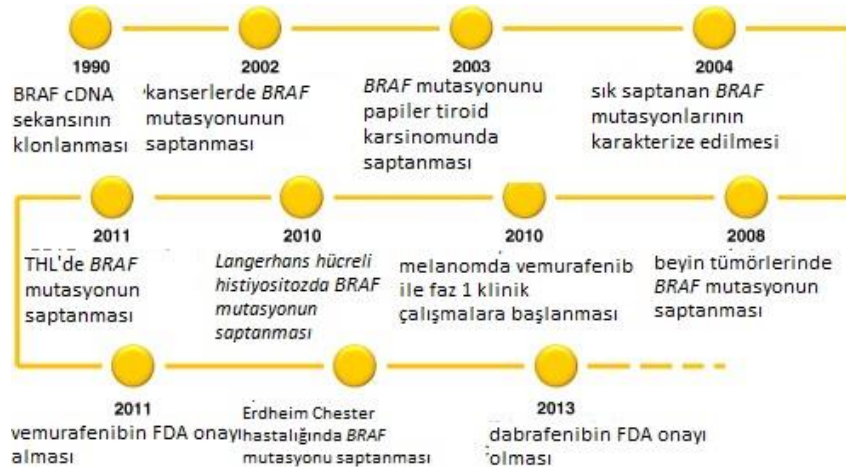
THL tedavisi sonrası sekonder malignite gelişimi riski konusunda fikir birliği yoktur. Bildirilen sekonder maligniteler; malign melanom, prostat kanseri, gastrointestinal kanserler ve Hodgkin dışı lenfomalardır. Purin analogları ile yapılan çalışmaların istatistiksel analizlerinde sekonder malignite gelişiminde risk artışı saptanmamıştır. BRAF mutasyonunun sekonder malignitenin gelişiminde etkisi araştırılmayı bekleyen bir alandır (16).

2.1.8.7. Prognoz

Son 30 yıl içerisinde, yeni tedavilerin kullanılmaya başlanması ile THL prognozunda önemli ilerlemeler görülmüştür. 1973-2008 yılları arasında THL tanısı konulmuş 3300'den fazla hastayı içeren büyük bir veri tabanı analizinde; bu süre zarfında ölüm riskinin %85 oranında azaldığı görülmüştür. İleri yaşta ve zenci olmak hastalık için bağımsız risk faktörleri olarak kabul edilmiştir (64).

2.2. BRAF GENİ, AKTİVASYON MEKANİZMASI VE BRAF V600E MUTASYONU

BRAF geni ilk kez 2002 yılında, malign melanom hastalarında, onkogen olarak tanımlanmıştır (9). BRAF; mitojenle aktive olan protein kinaz/ekstraselüler sinyalle regüle kinaz (MAPK/ERK) yolağında görevli bir serin/treonin protein kinazdır. BRAF mutasyonu birçok kanserde saptanmıştır. Mutasyonun saptanması BRAF inhibitörlerinin klinikte kullanımına olanak vermiştir. Aşağıdaki tabloda, BRAF ile ilgili araştırmaların özeti sunulmaktadır (65).



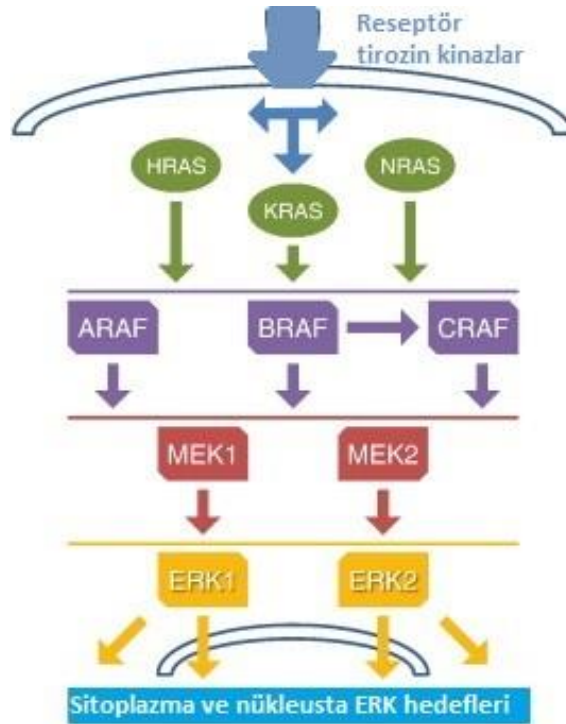
Şekil 4: BRAF araştırmalarının kısa tarihi (66)

2.2.1. Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) Sinyal İletim Yolağı

MAPK yolağında görevli bu proteinler mitojenle aktiflenen protein kinazlar süper ailesinde yer alırlar. Ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan bu proteinler hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında çok önemlidir. Bu sinyal iletim yolları embriyogenez, hücrenin yaşaması, çoğalması, farklılaşması ve apoptozun düzenlenmesinde rol almaktadır (67).

Pek çok büyüme faktörü ve hormonu gibi hücre dışı sinyal proteini hücre içine sinyali reseptör tirozin kinazlar aracılığıyla iletir (EGF, PDGF, IGF-1). Bir sinyal proteininin ligand bağlanma bölgesine bağlanmasıyla hücre içi tirozin kinaz bölgesi otofosforilasyonla aktiflenmekte ve Grb-2, sos gibi adaptör proteinler aracılığı ile monomerik GTPaz ailesinden olan RAS proteinini aktifleştirmektedir (66, 67).

MAPK yolağı hücre yüzey reseptörlerinden aldığı sinyalleri gen ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörlerine iletir. Aynı zamanda apoptoza katılan pek çok proteinin aktivitesini de düzenler. BCR-ABL gibi translokasyonlarla, Flt-3, Kit, Fms gibi sitokin reseptörlerindeki mutasyonlarla veya EGFR gibi normal tip veya mutant tip reseptörlerin aşırı eksprese edilmesi sonucu çeşitli tümörlerde MAPK yolağı aktive olur. Proteinlerin fosforillenmesi ile aktive veya inaktive edilen pek çok kinaz, transkripsiyon faktörleri, apoptotik düzenleyici ve kaspaz yıkıcı aileleri içeren bu karmaşık yolak üzerinde halen çok sayıda çalışma yapılmaktadır (66, 67).



Şekil 5: Mitojenle aktive olan protein kinaz/ekstraselüler sinyalle regüle kinaz yolağı (MEK/ERK). Ligand reseptör tirozin kinaza bağlandıktan sonra RAS aktive olur, ardında RAF-MEK-ERK fosforilasyon kaskadı aktiflenir. ERK sitozol ve nükleusta proteinleri fosforile eder (66).

Bu yolağın üst kademelerinde yer alan membran reseptörlerinden RAS ve BRAF genlerindeki veya RAF aktivitesini düzenleyen diğer yolaklardaki (örn. PI3K, PTEN, Akt) mutasyonlar sonucu insan kanserlerinde MAP kinaz yolağı anormal biçimde aktif olur. Dolayısıyla MAPK yolağı yeni ilaçların geliştirilmesi açısından çok önemli bir yere sahiptir. RAS, RAF, MEK ve alt kademelerdeki diğer hedef moleküllerin inhibitörleri geliştirilmiştir ve klinik çalışmalar halen devam etmektedir (66, 67).

2.2.2. RAS proteini

Membrana kovalent olarak bağlı bulunan RAS, guanin difosfat (GDP) bağlı iken inaktif; guanin trifosfat (GTP) bağlı iken aktiftir. RAS proteini gen regülasyonu ile hücre çoğalması ve farklılaşmasında rol oynamaktadır. Mutant RAS geninin hiperaktif ürünü sürekli GTP bağlı formda kalmakta ve tümör gelişimine neden olmaktadır. İnsan tümörlerinin yaklaşık %30'unda RAS mutasyonu bulunmaktadır. GTP bağlayıp aktif hale geçen RAS proteini RAF proteinini sitozolden plazma membranına çekmekte ve hem protein-tirozin, hem de protein-serin/treonin kinazları fosforilleyerek aktive etmektedir. Ayrıca aşağı doğru bir seri serin-treonin kinazın fosforilasyonunu başlatmaktadır (67).

2.2.3. RAF Kinaz

RAS'ın ilk ve en iyi tanımlanan alt kademe efektörü RAF'tır. RAF serin/treonin kinaz ailesinin C-RAF, A-RAF ve B-RAF olmak üzere 3 izoformu vardır. Her bir izoformda korunmuş olan CR1, CR2, CR3 ortak bölgeleri ve çeşitli düzenleyici fosforilasyon bölgeleri vardır. CR1 RAS'a bağlanma bölgesidir. CR2, S259 (serin) kalıntısından Akt veya protein kinaz A ile fosforillenerek RAF aktivitesinin negatif olarak düzenlendiği bölgedir. CR3, S338, Y340, Y341 kalıntılarından fosforillendiğinde RAF aktivitesinin attırdığı kinaz bölgesidir. RAF izoformları hücreye spesifik ekspresyonlarına, kinaz aktivitesinin şiddetine göre farklılıklar gösterirler ve hem tek başlarına, hem de birlikte düzenleyici fonksiyonlar yerine getirirler (67).

2.2.4. BRAF

BRAF (v-Raf fare sarkomu viral onkogen homoloğu B1) insanlarda BRAF geni tarafından kodlanır. Tüm RAF kinazların içinde MAP kinaz yolağının en güçlü aktivatörü BRAF'tır. BRAF geni, 7. kromozomun uzun kolunda (7q34) yer alır ve 18 adet ekzon içermektedir. BRAF "aktive edici" missense nokta mutasyonları 11. ve 15. ekzonlarında yer alır, T1799A transversiyon mutasyonu BRAF mutasyonlarının %80'den fazlasından sorumludur. T1799A mutasyonu protein ürününde V600E (önceki ismi V599E) amino asit değişimine ve dolayısı ile BRAF kinazın sürekli aktif kalmasına neden olur. BRAF V600E mutasyonunun onkojenik ve transforme edici etkisi gösterilmiştir. İlk keşfinden bu yana BRAF mutasyonlarının çeşitli insan kanserlerinde değişik sıklıklarda bulunduğu bildirilmiştir. En sık THL'de olmak üzere (%100), azalan sıklıkla, pilositik astrositom, Langerhans hücreli histiyositoz, papiller tiroid kanseri, malign melanom ve düşük gradlı over kanserlerinde saptanır. V600E mutasyonu dışında malign melanomda V600K, V600R ve V600D gibi nadir mutasyonlar da saptanmıştır (4, 5, 6, 7, 8, 9, 66).

BRAF mutasyonları, genellikle belli bir kanser türünün tek bir alt tipinde saptanmaktadır. Bütün tiroid kanserleri arasında sadece papiller tiroid karsinomunda, B hücreli lenfoid maligniteler içerisinde sadece THL'de pozitif saptanmıştır. V600E mutasyonunun THL'de hastalık tanımlayıcı olduğu kanıtlandıktan sonra, MEK ve ERK proteinlerinin fosforile halinin THL'de gösterilmesi ile bu mutasyonla MAPK yolağının aktiflendiği kanıtlanmıştır (23). THL'yi taklit eden THL-v, SMZL gibi hastalıklar başta olmak üzere diğer B hücre kökenli krinik lenfoproliferatif hastalıklarda bu mutasyonun bulunmaması hastalık tanısında kolaylık sağlayacaktır. Ayrıcı purin analoguna ve interferon- α 'ya dirençli vakalarda

BRAF inhibitörleri vemurafenib ve dabrafenibin remisyon sağladığı gösterilmiştir (10, 11, 63, 65).

BRAF mutasyonunun saptanmasının ardından, şu ana dek THL araştırmalarında kullanılan hücre dizilerinin BRAF mutasyonu taşımadığı gösterilmiş, çalışmalarda kullanımlarının yararı tartışılmaya başlanmıştır (66).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. HASTALAR VE TAKİP

Bu çalışma İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD Hematoloji Bilim Dalı Polikliniği ve Moleküler Hematoloji Laboratuvarında yapıldı. İstanbul Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylandı ve İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu (Proje No:26944) tarafından desteklendi.

Çalışmamıza Temmuz 2012 ve Haziran 2014 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD Hematoloji Polikliniğinde yeni tanı konmuş veya takibi yapılan 22 THL hastası alındı. Hastalara ve kontrollere çalışma hakkında bilgi verildi ve gönüllü olduklarına dair aydınlatılmış onamları alındı. Rutin tetkikleri sırasında kan verirken bir de çalışma için kan vermeleri istendi.

Hastaların eski laboratuvar kayıtları ve klinik verilerine ve bilgisayar kayıtlarına bakılarak bilgileri elde edildi. Hastaların splenomegali boyutu, hemoglobin lökosit, trombosit sayımları, kemik iliği biyopsi bulguları, immunofenotipler ve hastaların son durumları kaydedildi.

Kontrol grubu olarak daha önce hematoloji polikliniğinde takibi yapılan B hücreli kronik lenfoproliferatif hastalığı olan 10 hasta kullanıldı.

Hastalardan ve sağlıklı kontrollerden alınan kan örneğinden Moleküler Hematoloji Laboratuvarı'nda öncelikle DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA'da RT-PZR yöntemi ile *BRAF* mutasyonunun varlığı ya da yokluğu saptandı

3.2. METOD

3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için, alınan periferik kan örneğinden kit kullanım kılavuzunda belirtilen şekilde DNA izole edildi (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Almanya). İzolasyon sonrası DNA miktar tayini 260 nm'de spektrofotometrik ölçümlerdeki absorpsiyon oranlarına göre belirlenmiştir.

Ön hazırlık: Yıkama Tamponu II (mavi kapaklı)'ye 40ml mutlak etanol eklendi. Yıkama Tamponu I (siyah kapaklı)'e 20ml mutlak etanol eklendi.

1. Fankon tüpüne 200 µl (minimum) kemik iliği veya periferik kan, 200 µl binding buffer ve 40 µl proteinaz K konularak karıştırıldı ve 70 °C’de 10 dakika inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonrasında isopropanol (100 µl) alkol eklenerek kısa bir vorteks uygulandı.
3. Toplama tüplerinin içine “High Pure Filter tüpleri” (kolon) yerleştirildi.
4. Her bir örnek kolonlara pipetlendi (kolonların kapasitesi maksimum 700 µl dir).
5. 8.000 g’de 1dk santrifüj edildi.
6. Toplama tüplerinde biriken sıvı atıldı.
7. 500 µl (sabit miktar) inhibitör removal buffer eklendi.
8. 8.000 g’de 1dk santrifüj edildi.
9. Toplama tüplerinde biriken sıvı atıldı.
10. 500 µl (sabit miktar) wash buffer eklendi. Bu işlem 2 defa tekrarlandı.
11. 8000g de 1dk santrifüj edildi.
12. 2dk maksimum devirde santrifüj edildi.
13. Toplama tüplerinde biriken sıvı atıldı.
14. Kolonlar 1,5ml lik steril, kapaklı, Dnase/RNase Free mikrosantrifüj tüplerine konuldu.
15. 50-100 µl “Elution Buffer” eklendi.
16. 1 dk 8000 g’de santrifüj edildi.
17. Tüpün içine süzülen elution buffer çekilip tekrar kolona yüklendi (eğer kolonda DNA kalmışsa 2 kere bu işlem yapılarak iyice süzülmesi sağlanmış olunur).
18. 1 dk 8000 g’de santrifüj edildi.
19. Kolonlar atıldı.

3.2.2. Elde Edilen DNA’nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini

Elde edilen DNA örneklerinde konsantrasyon ve miktar tayini yapmadan önce her örnekten 20 µl alınarak üzeri 380 µl 0.5X TE tamponu ile tamamlandı ve bu şekilde 1/20 dilüsyonu sağlandı. Bu dilüsyon örneklerinin daha sonra spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında optik dansite ölçümleri yapıldı.

Spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA’nın saflığı ve konsantrasyonu belirlendi. 50µg/ml çift iplikçikli DNA içeriğinin 260 nm dalga

boyunda 1 optik densite (OD) verdiği kabul edilmektedir. 260 nm'deki ölçüm değeri aşağıdaki formüle uygulanarak DNA konsantrasyonu hesaplandı.

DNA Konsantrasyonu: $OD_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Sulandırma oranı}$
--

DNA örneklerinin saflığı OD_{260}/OD_{280} oranı kullanılarak belirlendi. Yeterince iyi saflıkta kabul edilen DNA'nın OD_{260}/OD_{280} değeri yaklaşık 1,8'dir. Ortamda fenol veya protein mevcutsa bu oran 1,8'den küçük olacaktır. OD_{260}/OD_{280} değeri 2'den büyükse ortamda RNA bulunduğu anlamına gelir.

3.2.3. BRAF V600E Mutasyon Analizi

Hasta grubundan alınan 5 ml perifer kanı örneğinden DNA izolasyon kitiyle elde edilen DNA örneklerinde spektrofotometrik olarak saflık ve konsantrasyon tayini yapıldıktan sonra Real-Time PZR yöntemi ile mutasyon varlığı yada yokluğunu tespit edildi.

3.2.3.1. PZR'de Kullanılan Kimyasal Maddeler

DNA Taq polimeraz enzimi (5U/ μ l) (Fermentas EPO402)

PZR reaksiyonundaki konsantrasyonu 2,5 U olacak şekilde 50 μ l'lik PZR karışımına 0,5 μ l eklendi.

10 X Taq PZR Tamponu (NH_4)SO₄'lü (Fermentas EPO402)

Tris-HCl'den 100 mM (pH 8,8, 25°C'de), 500 mM KCl ve %0,8 Nonidet P40 içeren 10X Taq PZR tamponundan 50 μ l'lik PZR karışımına 5 μ l eklendi.

MgCl₂ (25 mM/ml, Fermentas EPO402)

50 μ l'lik PZR karışımına 1,6 μ l MgCl₂ eklendi. dNTP'ler (100 μ mol/ml)(Fermentas R0171) dNTP'lerden (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 10'ar μ l alınıp (toplam 40 μ l) 1 ml'lik tüpe konuldu ve üzerine 960 μ l distile su eklenerek (dH₂O) 1000 μ l 1 mM'lık dNTP karışımı hazırlandı ve -20°C'de saklandı. 50 μ l'lik PZR karışımına 3 μ l eklendi.

3.2.3.2. BRAF Geni İçin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

BRAF geninin 15. ekzonunda ortaya çıkan BRAF V600E mutasyonunun belirlenmesi için gen bölgesini çoğaltmada kullanılan primerlerin dizisi aşağıda verildiği şekildedir. Bu primerler insan genom veritabanları kullanılarak doğrulanmış primer dizileridir.

İleri Primer 1: 5' - TAG GTG ATT TTG GTC TAG CTA CAG T-3'

İleri Primer 2: 5' - GGT GAT TTT GGT CTA GCT ACA AA-3'

Geri Primer: 5' GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG A-3'

BRAF geninin 15. ekzonunun çoğaltılması için PZR karışımı aşağıdaki gibidir:

50 µl'lik karışım; dH₂O 33µl, dNTP 3 µl, PZR tamponu 5 µl, MgCl₂ 1,6 µl, her bir primerden 0,5 µl, Taq polimeraz 0,4 µl. Normal tip ve mutant tip ekzon 15'i çoğaltmak üzere her örnek için ikiyeşer tüp hazırlandı. Normal tip için ileri primer 1; mutant tip için ileri primer 2 kullanıldı. İkisinde de aynı geri primer kullanıldı. Taq polimeraz eklendikten sonra tüp içindeki bileşenler pipetleme işlemi ile karıştırıldı. Örnek sayısı kadar 0,2 ml'lik tüplere 44 µl PZR karışımı konuldu. Daha sonra her tüpe 6 µl DNA (30-100 ng) eklendi. Tüpler PZR cihazına yerleştirildi.

3.2.3.3. PZR Şartları

BRAF geninin 15. ekzonunun çoğaltılmasında kullanılan primerler için bağlanma ısı 58°C olarak saptanmıştır. Optimize edilmiş PZR şartları Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3: PZR Şartları

94 °C	
94 °C	
58 °C	45 döngü
72 °C	
72 °C	

4. BULGULAR

Çalışmamıza Temmuz 2012 ve Haziran 2014 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD Hematoloji yeni tanı konulmuş ve remisyonundaki 22 hasta alınmıştır. Kronik lenfoproliferatif hastalık tanılı 10 hasta kontrol grubu olarak alınmıştır. THL hastalarının medyan yaşı 45 (38-73) idi. Hastaların %82'si erkek, %18'i kadındı. Erkek /kadın oranı 4.5 olarak bulundu. Hastaların 10 (%45) tanesi yeni tanı konmuş, 12 tanesi önceden tedavi görmüş remisyonunda olan hastalardı (%55). Hasta bilgileri tablo 4 ve 5'te verilmiştir.

Kontrol grubundaki hastaların hiçbirinde *BRAF* V600E mutasyonu saptanmadı.

Yeni tanı konan ve tedavi öncesi perifer kanı analizi yapılan 10 hastanın 8'inde mutasyon saptandı. Mutasyon saptanmayan bir hasta (Hasta 1), kemik iliği ve akım sitometri sonuçları THL ile uyumlu olmasına rağmen, kladribin tedavisi sonrası remisyonla girmede, uzun süre nötropenik kalan hasta akciğer mantar enfeksiyonu nedeniyle kaybedildi (Hasta 1). Mutasyonun negatif saptandığı diğer hastanın ise diğer 9 hastanın aksine başvuru sırasında lökositozu mevcuttu. Biyopsi ve akım sitometri bulguları THL ile uyumlu olan hastanın kladribin tedavisi sırasında komplikasyon yaşanmadı, takiplerine dış merkezde devam ettiği için bilgilerine ulaşılamadı (Hasta 7). Hastaların hepsinde purin analogu olarak kladribin tercih edildi. Tedavi sonrası altı hastanın beş tanesine febril nötropeni (Hasta 1, 3, 6, 9, 10), bir tanesine idrar yolu enfeksiyonu tanısıyla geniş spektrumlu antibiyoterapi başlandı (Hasta 2). Bir ilaca bağlı deri döküntüsü gelişti (Hasta 4). Bir hastada taburcu edildikten sonra poliklinik takibinde zona zoster enfeksiyonu gelişti (Hasta 10). On hastanın 2'si enfeksiyonlar sebebiyle öldü (Hasta 1 ve 3). Mutasyonu pozitif saptanan hasta uzamış febril nötropeni sonrası septik şok tablosu ile kaybedildi (Hasta 3). Sekiz hastada kladribin tedavisi ile tam remisyon ve mutasyonda negatifleşme sağlandı.

Remisyonunda takip edilen 12 hastanın hiçbirinde ilk tedaviler öncesi mutasyon varlığı bilinmemekteydi. Bir hasta hariç hepsi tipik bir tablo ile prezente olmuştu. Bir hastaya sağ femurdaki litik lezyondan alınan biyopsi sonrası tanı konulmuştu, periferik kan tablosu normal olmasına rağmen iki taraflı kemik iliği biyopsilerinde infiltrasyon saptanmıştı (Hasta 21). En eski tanılı hasta hariç diğer hastalar ilk basamakta kladribin tedavisi almıştı Bir hastada remisyon sağlanmış olmasına rağmen hipersplenizm nedeniyle splenektomi yapılmıştı (Hasta 16). En eski tanılı hastaya kladribin öncesinde splenektomi ve IFN- α verilmişti (Hasta

12). Bir hastaya rituksimab verildi (Hasta 18). Dört hasta takiplerinde nüks gelişmesi nedeniyle ikinci kez kladribin tedavisi almış, remisyonda takip edilen hastalardı (Hasta 12, 17, 19 ve 21). Sağ femurdaki litik lezyonun biyopsisi ile tanı konulan hastaya kladribin tedavisi öncesinde bölgesel radyoterapi uygulanmıştı, tedavisi PET-FDG görüntülemesi ile yönlendirilmekteydi (Hasta 21). *BRAF* V600E mutasyonu 4 hastada pozitif saptandı (Hasta 16, 18, 19 ve 22). Bunlardan bir tanesi ilk tedavi sonrası kısmi remisyona giren, 2001’de kemik iliği biyopsisinde nüks bulguları saptanan fakat sitopenisi olmaması nedeniyle tedavisiz takip edilen, zamanla semptomların ve sitopenilerin gelişmesi nedeniyle tedavi planlanan bir hastaydı. Önceki kladribin tedavisi sonrası otoimmün hemolitik anemi gelişmesi nedeniyle, kladribin verilemedi. Hastaya 4 kür rituksimab verildi, sitopenileri düzelmeyen hastanın yakın takibi devam etmekteydi (Hasta 18).

Toplam dört hastada *BRAF* mutasyonu saptandı. Mutasyonun pozitif saptandığı 2 hasta klinik ve laboratuvar olarak tam remisyundaydı (Hasta 16, 22) Kladribin tedavisi sonrası takiplerinde nüks saptanan bir hastada mutasyon pozitif, ikinci kür kladribin ile tedavi sonrası alınan perifer kanında mutasyon negatiflemişti (Hasta 21). Sadece bir hastada takiplerinde sekonder malignite gelişti (Hasta 12). Lenfosit hakimiyetinde lökositozu olması nedeniyle yapılan periferik yayma ve akım sitometri bulguları T hücreli KLL ile uyumlu olan hastada, *BRAF* V600E mutasyonunun da negatif saptanması, tablonun THL nüksü olmadığını anlaşıldığında yardımcı oldu.

Tablo 4: Yeni tanı konan hastalar

YENİ TANI KONAN HASTALAR											
YAŞ	CİNSİYET	KEMİK İLİĞİ BULGULARI	CD20	CD103	CD25	CD11c	BRAF V600E	TEDAVİ	YAN ETKİ	HASTALIĞIN DURUMU	
1	39 E	TRAP +	+	+	+	+	-	Kladribin	Febril nötropeni	Remisyona girmedi, febril nötropeni, eksitus	
2	73 E	TRAP Anneksin +	+	+	+	+	+	Kladribin	İYE	Remisyonda	
3	72 K	TRAP Anneksin +	+	+	+	+	+	Kladribin	Febril nötropeni	Febril nötropeni nedeniyle eksitus	
4	58 E	TRAP Anneksin +	+	+	+	+	+	Kladribin	Deri döküntüsü	Remisyonda, tedavi sırasında febril nötropeni	
5	52 E	TRAP Anneksin +	+	+	+	+	+	Bilinmiyor	-	Bilinmiyor	
6	51 K	TRAP Anneksin +	+	+	+	+	+	Kladribin	Febril nötropeni	Remisyonda	
7	39 E	TRAP Anneksin +	+	+	+	+	-	Kladribin	Ateş	Bilinmiyor	
8	64 E	TRAP Anneksin +	+	+	+	+	+	Kladribin	-	Remisyonda	
9	49 K	TRAP Anneksin +	+	+	+	+	+	Kladribin	Febril nötropeni	Remisyonda	
10	43 K	TRAP Anneksin +	+	+	+	+	+	Kladribin	Febril nötropeni	Remisyonda	
									Zona zoster		

Tablo 5: Remisyondaki hastalar

REMİSYONDAKİ HASTALAR										
YAŞ	CİNSİYET	KEMİK İLİĞİ BULGULARI	CD20	CD103	CD25	CD11c	BRAF V600E	TEDAVİ	HASTALIĞIN DURUMU	
11	64 E	TRAP +	+				-	Kladribin	Remisyonda	
12	47 E	TRAP +	+				-	Splenektomi, IFN- α , 2xKladribin	Remisyonda, T hücreli KLL gelişmiş	
13	44 E	TRAP +	+				-	Kladribin	Remisyonda	
14	55 E	TRAP +	+				-	Kladribin	Remisyonda	
15	45 E	TRAP +	+				-	Kladribin	Remisyonda	
16	49 E	TRAP +	+				+	Kladribin + splenektomi	Remisyonda	
17	50 E	TRAP +	+				-	2 x Kladribin	Remisyonda	
18	47 E	TRAP +	+				+	Kladribin, 4 kür rituksimab	Kısmi remisyonda	
19	38 E	TRAP Anneksin +	+	+	+	+	+	2 x Kladribin	Remisyonda	
20	55 E	TRAP +	+				-	Kladribin	Remisyonda, sekonder eritrositoz gelişmiş	
21	55 E	TRAP Anneksin +, sağ femurda litik lezyon	-	-	-	-	-	RT + 2 x Kladribin	Remisyonda	
22	45 E	TRAP +	+	+	+	+	+	2 x Kladribin	Remisyonda	

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

THL, nadir görülen bir kronik lenfoproliferatif hastalıktır. Klinik, kemik iliği biyopsisi ve akım sitometri bulgularıyla diğer B hücreli lenforproliferatif hastalıklardan farklılık gösterir. Etiyolojisi diğer hematolojik hastalıklar kadar iyi aydınlatılabilmiş değildir. Son 25 yılında tanı ve tedavisinde yaşanan gelişmeler ile prognozda önemli ilerlemeler kat edilmiştir. 2011 yılında, *BRAF* V600E mutasyonu THL hastalarının hepsinde pozitif saptanmışken, diğer B hücreli kronik lenfoproliferatif hastalıklarda mutasyonun var olmadığı görülmüştür. Ardından, THL patogenezi aydınlatmayı amaçlayan birçok çalışma yapılmaya başlanmıştır.

Çalışmamızda, yeni tanı konan ve remisyondaki hastaların perifer kanında *BRAF* V600E mutasyonu varlığı araştırılmıştır. Hastaların %82'si erkek, %18'i kadın ve ortalama yaş 45'tir. Bu bulgular, daha önce yayınlanmış demografik verilerle benzerlik göstermektedir (3).

Çalışmaya alınan yeni tanı konmuş THL hastalarında, klinik veriler, patoloji ve akım sitometri bulgularının THL için tipik olduğu vakalarda mutasyon pozitif saptanmıştır. Bulguların tipik olduğu vakalarda, perifer kanında *BRAF* mutasyonu bakılması gerekli olmayabilir. Tanıda zorluk yaşanan, tedaviye dirençli vakalarda mutasyon varlığının araştırılması yardımcı olacaktır.

Kladribin tedavisi sırasında %60 oranında ateş görülmüştür. Bu oran, daha önce bildirilen çalışmalara göre daha sıktır. Hastaların hepsine geniş spektrumlu antibiyoterapiler başlanmış, takiplerinde ateş gerilemiştir. THL'de teorik olarak infeksiyonlara yatkınlık olduğu düşünülmekte, fakat yurtdışı kılavuzlarda antibiyotik profilaksisi önerilmemektedir (33). Türkiye'de tanı konulan THL hastalarına purin analogu tedavisi ile birlikte antibiyotik profilaksisi verilmesi uygundur.

Klinik ve laboratuvar olarak remisyonda olan 10 hastanın 2 tanesinde (%20) mutasyon pozitif saptanmıştır. Daha önce tedavi almış ve mutasyonun pozitif saptandığı bir hastada nüks gelişmiş, öbür hastanın ise kısmi remisyonda olduğu görülmüştür. Bu hastaların moleküler olarak tam yanıtı olmadıkları düşünüldü. Remisyonda olan hastalarda *BRAF* mutasyonu bakılmasına nüks ya da tedavi başarısızlığı şüphesi olmadığı sürece gerek olmayabilir. Kladribin ve rituksimab tedavileri sonrası halen sitopenileri düzelmemiş olan kısmi remisyondaki hastaya *BRAF* inhibitörü verilmesi düşünülebilir.

Sonuç olarak, BRAF V600E mutasyonun tayini, THL tanısının konmasında yardımcı olabilir, negatif saptanması durumunda THL dışı B hücreli kronik lenfoproliferatif hastalıklara yönelmek gerekir. Remisyonadaki hastalarda ise tam moleküler yanıtın araştırılmasında kullanılıp kullanılamayacağı araştırılmayı bekleyen bir konudur.

KAYNAKLAR

1. "Hairy cell leukemia smear 2009-08-20" by Paulo Henrique Orlandi Mourao - Own work. Licensed under CC BY-SA 3.0 via Wikimedia Commons - http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hairy_cell_leukemia_smear_2009-08-20.JPG#mediaviewer/File:Hairy_cell_leukemia_smear_2009-08-20.JPG.
2. Arcaini L, Zibellini S, Boveri E, et al. The *BRAF* V600E mutation in hairy cell leukemia and other mature B-cell neoplasms. *Blood*. 2012;119(1):188-191.
3. Arons E, Roth L, Sapolsky J, Suntum T, Stetler-Stevenson M, Kreitman RJ. Evidence of canonical somatic hypermutation in hairy cell leukemia. *Blood*. 2011 May 5;117(18):4844-51.
4. Arons E, Suntum T, Stetler-Stevenson M, Kreitman RJ. VH4-34+ hairy cell leukemia, a new variant with poor prognosis despite standard therapy. *Blood*. 2009;114(21):4687.
5. Badalian-Very G, Vergilio JA, Degar BA et al. Recurrent *BRAF* mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood*. 2010;116(11):1919.
6. Basso K, Liso A, Tiacchi E, et al. Gene expression profiling of hairy cell leukemia reveals a phenotype related to memory B cells with altered expression of chemokine and adhesion receptors. *J Exp Med*. 99(1):59-68, 2004 Jan 5.
7. Blombery P, Wong SQ, Hewitt CA, et al. Detection of *BRAF* mutations in patients with hairy cell leukemia and related lymphoproliferative disorders [published online ahead of print December 1, 2011]. *Haematologica*. 10.3324/haematol.2011.05487.
8. Bouroncle BA, Wiseman BK, Doan CA. Leukemic reticuloendotheliosis. *Blood*. 1958;13(7):609-630.
9. Burtham J, Cawley JC. The bone marrow fibrosis of hairy-cell leukemia is caused by the synthesis and assembly of a fibronectin matrix by the hairy cells. *Blood*. 1994;83(2):497.
10. By Billy10drs (Own work) [CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>) or GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>)], via Wikimedia Commons
11. Cassileth PA, Chevart B, Spiers AS et al. Pentostatin induces durable remissions in hairy cell leukemia. *J Clin Oncol*. 1991;9(2):243.
12. Cervetti G, Galimberti S, Andreazzoli F et al. Rituximab as treatment for minimal residual disease in hairy cell leukaemia. *Eur J Haematol*. 2004;73(6):412.
13. Cervetti G, Galimberti S, Andreazzoli F et al. Rituximab as treatment for minimal residual disease in hairy cell leukaemia: extended follow-up. *Br J Haematol*. 2008;143(2):296.
14. Chandran R, Gardiner SK, Smith SD, Spurgeon SE. Improved survival in hairy cell leukaemia over three decades: a SEER database analysis of prognostic factors. *Br J Haematol*. 2013 Nov;163(3):407-9. Epub 2013 Jul 24.
15. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with *BRAF* V600E mutation. *NEngl J Med*. 2011;364(26):2507-2516.
16. Cheson BD, Sorensen JM, Vena DA et al. Treatment of hairy cell leukemia with 2-chlorodeoxyadenosine via the Group C protocol mechanism of the National Cancer Institute: a report of 979 patients. *J Clin Oncol*. 1998;16(9):3007.
17. Cleary ML, Wood GS, Warnke R, Chao J, Sklar J. Immunoglobulin gene rearrangements in hairy cell leukemia. *Blood*. 1984;64(1):99.

18. Cornet E, Delmer A, Feugier P et al. Recommendations of the SFH (French Society of Haematology) for the diagnosis, treatment and follow-up of hairy cell leukaemia. *Ann Hematol.* 2014 Dec;93(12):1977-83.
19. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature.* 2002;417(6892):949-954.
20. Dietrich S, Glimm H, Andrulis M, et al. *BRAF* inhibition in refractory hairy-cell leukemia. *NEngl J Med.* 2012; 366(21):2038-2040.
21. Does GM, Matsuno RK, Weisenburger DD, Rosenberg PS, Anderson WF. Hairy cell leukaemia: a heterogeneous disease? *Br J Haematol.* 2008;142(1):45.
22. Ellison DJ, Sharpe RW, Robbins BA et al. Immunomorphologic analysis of bone marrow biopsies after treatment with 2-chlorodeoxyadenosine for hairy cell leukemia. *Blood.* 1994;84(12):4310.
23. Else M, Dearden CE, Matutes E et al. Long-term follow-up of 233 patients with hairy cell leukaemia, treated initially with pentostatin or cladribine, at a median of 16 years from diagnosis. *Br J Haematol.* 2009;145(6):733.
24. Else M, Ruchlemer R, Osuji N et al. Long remissions in hairy cell leukemia with purine analogs: a report of 219 patients with a median follow-up of 12.5 years. *Cancer.* 2005;104(11):2442.
25. Falini B, Tiacci E, Liso A et al. Simple diagnostic assay for hairy cell leukaemia by immunocytochemical detection of annexin A1 (ANXA1). *Lancet.* 2004;363(9424):1869.
26. Flinn IW, Kopecky KJ, Foucar MK et al. Long-term follow-up of remission duration, mortality, and second malignancies in hairy cell leukemia patients treated with pentostatin. *Blood.* 2000;96(9):2981.
27. Follows GA, Sims H, Bloxham DM et al. Rapid response of biallelic *BRAF* V600E mutated hairy cell leukaemia to low dose vemurafenib. *Br J Haematol.* 2013 Apr;161(1):150-3. Epub 2012 Dec 29.
28. Forconi F, Sahota SS, Raspadori D, Ippoliti M, Babbage G, Lauria F, Stevenson FK. Hairy cell leukemia: At the crossroad of somatic mutation and isotype switch. *Blood.* 104(10):3312-7
29. Foucar K, Falini B, Catovsky D, Stein H. Hairy cell leukaemia. In: Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al. eds. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2008:188-90.
30. Foucar K, Falini B, Catovsky et. al. Hairy cell leukemia. Campo E, Harris NL, et al, editors. *WHO classification of normal haematopoietic and lymphoid tissues*, ed 4, Lyon, 2008, International Agency for Research on Cancer (IARC).
31. Fox RM, Mann CJ, et al. Deoxyadenosine toxicity to human peripheral blood lymphocytes: Implications for 2-deoxyadenosine as a potential immunosuppressive drug. *Cancer Treat Symposia.* 1984; 2:30.
32. Golomb HM. Hairy cell leukemia: Treatment success in the past 25 years. *J Clin Oncol.* 2008 vol. 26 no. 16 2607-2609.
33. Grever MR. How I treat hairy cell leukemia. *Blood.* 2010;115(1):21.
34. Hall RD, Kudchadkar RR. *BRAF* Mutations: Signaling, Epidemiology, and Clinical Experience in Multiple Malignancies. *Cancer Control.* 2014 Jul;21(3):221-30.

35. Haroche J, Charlotte F, Arnaud L et al. High prevalence of *BRAF* V600E mutations in Erdheim-Chester disease but not in other non-Langerhans cell histiocytoses. *Blood*. 2012 Sep;120(13):2700-3. Epub 2012 Aug 9.
36. Hoffman MA, Janson D, Rose E, Rai KR. Treatment of hairy-cell leukemia with cladribine: response, toxicity, and long-term follow-up. *J Clin Oncol*. 1997;15(3):1138.
37. Kraut E. Infectious complications in hairy cell leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2011 Jun;52 Suppl 2:50-2. Epub 2011 Apr 19.
38. Kraut EH, Bouroncle BA, Grever MR. Pentostatin in the treatment of advanced hairy cell leukemia. *J Clin Oncol*. 1989;7(2):168.
39. Liliemark J, Albertioni F, Juliusson G, Eksborg S. A limited sampling strategy for estimation of the cladribine plasma area under the concentration versus time curve after intermittent i.v. infusion, s.c. injection, and oral administration. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1996;38(6):536.
40. Machincki MM, Stoklosa T. *BRAF* — A new player in hematological neoplasms. *Blood Cells Mol Dis*. 2014 Jun-Aug;53(1-2):77-83.
41. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*. 2006;107(1):265.
42. Noel P. Definition of remission, minimal residual disease, and relapse in hairy cell leukemia bone marrow biopsy histology and immunohistology specimens. *Leuk Lymphoma*. 2011 Jun;52 Suppl 2:62-4.
43. Ozkok A, Elcioglu OC, Akpinar TS, Nalcaci M. Vasculitis in a patient with hairy cell leukemia. *Intern Med*. 2011;50(21):2713.
44. Peyrade F, Re F, Ginet C. et al. Low-dose vemurafenib induces complete remission in a case of hairy-cell leukemia with a V600E mutation. *Haematologica*. 98 (2013), pp. e20–e22
45. Piro LD, Carrera CJ, Carson DA, Beutler E. Lasting remissions in hairy-cell leukemia induced by a single infusion of 2-chlorodeoxyadenosine. *N Engl J Med*. 1990;322(16):1117.
46. Raess PW, Mintzer D, Husson M et al. *BRAF* V600E is also seen in unclassifiable splenic B-cell lymphoma/leukemia, a potential mimic of hairy cell leukemia. *Blood*. 2013 Oct;122(17):3084-5.
47. Ravandi F, Jorgensen JL, O'Brien SM. Eradication of minimal residual disease in hairy cell leukemia. *Blood*. 2006;107(12):4658.
48. Ravandi F, O'Brien S, Jorgensen J et al. Phase 2 study of cladribine followed by rituximab in patients with hairy cell leukemia. *Blood*. 2011 Oct;118(14):3818-23. Epub 2011 Aug 5.
49. Ravandi F. Hairy Cell Leukemia. Hoffman R, Benz EJ, Silberstein EJ et al, editors. *Hematology: Basic Principles and Practice*, p. 1191-1202 ed 6, 2013.
50. Rosen DS, Smith S, Gurbuxani S, Yamini B. Extranodal hairy cell leukemia presenting in the lumbar spine. *J Neurosurg Spine*. 2008 Oct;9(4):374-6.
51. Saven A, Burian C, Adusumalli J, Koziol JA. Filgrastim for cladribine-induced neutropenic fever in patients with hairy cell leukemia. *Blood*. 1999;93(8):2471.
52. Saven A, Burian C, Koziol JA, Piro LD. Long-term follow-up of patients with hairy cell leukemia after cladribine treatment. *Blood*. 1998;92(6):1918.

53. Schnittger S, Bacher U, Haferlach T, Wendland N, Ulke M, Dicker F, Grossmann V, Haferlach C, Kern W. Development and validation of a real-time quantification assay to detect and monitor *BRAF*V600E mutations in hairy cell leukemia. 2012;119(13):3151.
54. Seymour JF, Kurzrock R, Freireich EJ, Estey EH et al. 2-chlorodeoxyadenosine induces durable remissions and prolonged suppression of CD4+ lymphocyte counts in patients with hairy cell leukemia. *Blood*. 1994;83(10):2906.
55. Seymour JF, Talpaz M, Kurzrock R. Response duration and recovery of CD4+ lymphocytes following deoxycoformycin in interferon-alpha-resistant hairy cell leukemia: 7-year follow-up. *Leukemia*. 1997;11(1):42.
56. Shao H, Calvo KR, Grönborg M et al. Distinguishing hairy cell leukemia variant from hairy cell leukemia: development and validation of diagnostic criteria. *Leuk Res*. 2013;37(4):401.
57. Shao H, Calvo KR, Grönborg M, Tembhare PR, Kreitman RJ, Stetler-Stevenson M, Yuan CM. Distinguishing hairy cell leukemia variant from hairy cell leukemia: development and validation of diagnostic criteria. *Leuk Res*. 2013;37(4):401.
58. Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer*. 2011 Nov;105(11):1684-92. Epub 2011 Nov 01.
59. Spiers AS, Moore D, Cassileth PA et al. Remissions in hairy-cell leukemia with pentostatin (2'-deoxycoformycin). *N Engl J Med*. 1987;316(14):825.
60. Thomas DA, O'Brien S, Bueso-Ramos C et al. Rituximab in relapsed or refractory hairy cell leukemia. *Blood*. 2003;102(12):3906.
61. Tiacci E, Liso A, Piris M, Falini B. Evolving concepts in the pathogenesis of hairy-cell leukemia. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(6):437.
62. Tiacci E, Schiavoni G, Forconi F, et al. Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the *BRAF*-V600E mutation. *Blood*. 2012;119(1):192-195.
63. Tiacci E, Schiavoni G, Martelli MP et al. Constant activation of the RAF-MEK-ERK pathway as a diagnostic and therapeutic target in hairy cell leukemia. *Haematologica*. 98(4):635-9; 2013 Apr.
64. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, et al. *BRAF* mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2011;364(24):2305-2315.
65. Ward FT, Baker J, Krishnan J, Dow N, Kjobech CH. Hairy cell leukemia in two siblings. A human leukocyte antigen-linked disease? *Cancer*. 1990;65(2):319.
66. Westbrook CA, Golde DW. Autoimmune disease in hairy-cell leukaemia: clinical syndromes and treatment. *Br J Haematol*. 1985;61(2):349.
67. Xi L, Arons E, Navarro W, Calvo KR, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Kreitman RJ. Both variant and IGHV4-34-expressing hairy cell leukemia lack the *BRAF* V600E mutation. *Blood*. 2012 Apr;119(14):3330-2. Epub 2011 Dec 30.
68. Xi L, Arons E, Navarro W, et al. Both variant and IGHV4-34-expressing hairy cell leukemia lack the *BRAF* V600E mutation. *Blood*. 2012;119(14):3330-3332.
69. Yam LT, Castoldi GL, Garvey MB, et al. Functional cytogenetic and cytochemical study of the leukemic reticulum cells. *Blood*. 1968; 32:90-101.