T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ HASTALARINDA FCRL GEN AİLESİ EKSPRESYON SEVİYELERİNİN IgVH MUTASYONU İLE KARŞILAŞTIRILMASI VE PROGNOZA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

**KÜBRA GÜNDÜZ**

**TEZ DANIŞMANI**
**PROF. DR. ENDER M. COŞKUNPINAR**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**
**TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**DOKTORA TEZİ**
**MART/2024**

# İTHAF

“Aileme ithaf ediyorum”

# TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında gerekli tüm imkanları sağlayan, doktora sürecim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, her zaman desteğini hissettiğim değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ender M. COŞKUNPINAR'a çok teşekkür ederim.

SBÜ Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.B.D. başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ülkan KILIÇ'a, Anabilim Dalımızda görevli diğer hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Yanlarına her gittiğimde beni tüm pozitiflikleriyle karşılayan ve tanışmaktan çok memnun olduğum, tez çalışmamdaki hastaların toplanmasındaki desteklerinden dolayı İÜ, İTF, İç Hastalıkları A.B.D. Hematoloji B.D.'dan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Mustafa Nuri YENEREL ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Simge ERDEM'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın İstanbul Üniversitesi'ndeki deneysel aşamalarında destek olan İç Hastalıkları A.B.D.'dan değerli ablalarım Dr. Ayşe Gül BAYRAK TOKAÇ, Dr. Esra SERT ve Uzm. Biyolog Ayla ŞAHİN'e çok teşekkür ederim.

Tezimin biyoinformatik analiz kısmındaki yardımlarından dolayı Dr. Deniz SİFOĞLU'na çok teşekkür ederim. Birlikte çalışmaktan memnun olduğum ve her konuda desteğini hissettiğim arkadaşım Uzm. Tıbbi Biy. Halime YILDIRIM'a çok teşekkür ederim.

Hayalim olan bu yolda beni koşulsuz ve sabırla destekleyen ve yaptıkları fedakarlıklar ile her zaman yanımda olan babam İhsan GÜNDÜZ, annem Hanife GÜNDÜZ ve kardeşlerim Seher, Bilgenur, Merve ve Mustafa'ya çok teşekkür ederim.

Çalışmaya katılmayı kabul etmiş tüm hastalara çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması 'Doktora Tez Projeleri' kapsamında Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (Proje No: 2021/164), Türk Hematoloji Derneği (Proje No: 2022/07) ve TÜSEB (Proje No: 16652) tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu tez çalışması 'TÜBİTAK BİDEB 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı' ve 'YÖK 100/2000 Doktora Bursu' ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Kübra GÜNDÜZ

# İÇİNDEKİLER

İTHAF ..... iv
TEŞEKKÜR ..... v
İÇİNDEKİLER ..... vi
TABLOLAR LİSTESİ ..... viii
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... x
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... xi
ÖZET ..... xiii
ABSTRACT ..... xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ ..... 1
2. GENEL BİLGİLER ..... 3
2.1. LENFOMALAR VE B HÜCRELİ NEOPLAZMLAR ..... 3
2.2. B LENFOSİTLERİN GELİŞİMİ ..... 5
2.3. KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ ..... 8
2.3.1. Tanım ..... 8
2.3.2. Epidemiyoloji ..... 8
2.3.3. Etiyoloji ..... 10
2.3.3.1. Genetik yatkınlık ..... 10
2.3.3.2. Sigara ..... 10
2.3.3.3. Vücut kitle indeksi ..... 10
2.3.3.4. Çevresel ve diğer etmenler ..... 10
2.3.4. Klinik ..... 11
2.3.4.1. Tanı ..... 11
2.3.4.2. Evreleme ..... 11
2.3.4.3. Tedavi ..... 14
2.3.5. KLL'de Prognoz ve Sağkalımı Etkileyen Faktörler ..... 15
2.3.5.1. IgVH somatik hipermutasyon durumu ..... 16
2.3.5.2. ZAP70 ..... 18
2.3.5.3. CD38 ..... 19
2.3.5.4. Serum belirteçleri ..... 19
2.3.5.5. Kromozomal anomaliler ..... 19
2.4. FC RESEPTÖR BENZERI PROTEİN (FCRL) ..... 24
3. GEREÇ VE YÖNTEM ..... 28
3.1. GEREÇLER ..... 28
3.1.1. Gönüllülerden Kan Örneklerinin Alınması ..... 28

3.1.2. Kimyasallar ..... 28
3.1.3. Kitler ..... 29
3.1.4. Cihazlar ..... 30
3.2. YÖNTEMLER ..... 31
3.2.1. Flow Sitometrik Analiz ..... 31
3.2.2. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Analizi ..... 31
3.2.3. Tüm Ekzon Dizileme (WES) Analizi ..... 32
3.2.4. Tam Kandan Total RNA İzolasyonu ..... 34
3.2.5. cDNA Eldesi ..... 35
3.2.6. PCR Optimizasyonu ve Gen Ekspresyon Seviyelerinin Analizi ..... 36
3.2.7. İstatistik Analiz ..... 37
3.2.8. Biyoinformatik Analiz ..... 38
4. BULGULAR ..... 39
4.1. KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ HASTALARININ KLİNİK VE GENETİK SONUÇLARI ..... 39
4.1.1. Klinik Değerlendirme Sonuçları ..... 39
4.1.2. Flow Sitometri Analizi Sonuçları ..... 45
4.1.3. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Analizi Sonuçları ..... 46
4.1.4. Tüm Ekzon Dizileme (WES) Analizi Sonuçları ..... 50
4.1.5. Gen Ekspresyon Analizi Sonuçları ..... 52
5. TARTIŞMA ..... 56
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER ..... 61
KAYNAKLAR ..... 63
EKLER ..... 69

# TABLOLAR LİSTESİ

**Tablo 2. 1:** 2016 WHO sınıflandırmasına göre B hücreli neoplazmlar ..... 4

**Tablo 2. 2:** Modifiye Rai evrelemesi ..... 12

**Tablo 2. 3:** Binet evrelemesi ..... 13

**Tablo 2. 4:** KLL-IPI sistemi ..... 13

**Tablo 2. 5:** KLL-IPI sistemi risk grupları ve sağkalım oranları ..... 14

**Tablo 3. 1:** Kimyasallar ..... 28

**Tablo 3. 2:** Kitler ..... 29

**Tablo 3. 3:** Cihazlar ..... 30

**Tablo 3. 4:** Genomic DNA elimination miks ..... 35

**Tablo 3. 5:** Reverse-transcription miks ..... 35

**Tablo 3. 6:** Real-time PCR reaksiyon bileşenleri ..... 36

**Tablo 3. 7:** Real-time PCR termal döngü koşulları ..... 37

**Tablo 4. 1:** Hastaların demografik verileri ile serum β2-M ve LDH sonuçları ..... 39

**Tablo 4. 2:** Hastaların evreleme sonuçları ..... 40

**Tablo 4. 3:** WES analizi yapılan hastaların KLL-IPI skorlama sonuçları ..... 40

**Tablo 4. 4:** Hastaların Rai evresi ile serum belirteçlerinin karşılaştırılması ..... 41

**Tablo 4. 5:** Hastaların Rai evresi ile CD38 ve WBC seviyelerinin karşılaştırılması ..... 42

**Tablo 4. 6:** Hastaların Binet evresi ile serum belirteçlerinin karşılaştırılması ..... 42

**Tablo 4. 7:** Hastaların Binet evresi ile CD38 ve WBC seviyelerinin karşılaştırılması ..... 43

**Tablo 4. 8:** KLL hastalarının biyokimyasal sonuçları ..... 44

**Tablo 4. 9:** KLL hastalarının hemogram sonuçları ..... 45

**Tablo 4. 10:** Hastaların flow sitometri analizi sonuçları ..... 46

**Tablo 4. 11:** Hastaların FISH analizi sonuçları ..... 49

**Tablo 4. 12:** Hastaların evreleme sonuçları ile kromozomal anomalilerin karşılaştırılması ..... 50

**Tablo 4. 13:** WES analizi yapılan hastaların IgVH mutasyon durumu ile klinik ve demografik parametrelerinin karşılaştırılması ..... 51

**Tablo 4. 14:** WES analizi sonucu bulunan patojenik varyantlar ..... 52

**Tablo 4. 15:** WES analizi sonucu bulunan olası patojenik varyantlar ..... 52

**Tablo 4. 16:** Fold regulation ve p değerleri ..... 53

# ŞEKİLLER LİSTESİ

**Şekil 2. 1:** B lenfositlerin gelişimi ..... 6

**Şekil 2. 2:** İmmünglobulin yapısı . ..... 7

**Şekil 2. 3: A)** Yıllara göre yeni vaka oranları **B)** Yıllara göre ölüm oranları ..... 9

**Şekil 2. 4:** KLL birinci basamak tedavi algoritması ..... 15

**Şekil 2. 5:** B hücresi gelişimi ve BCR olgunlaşması ..... 18

**Şekil 2. 6:** 13. kromozomda miRNA-15a/16-1 lokasyonu ..... 21

**Şekil 2. 7:** 11. kromozomda ATM gen lokasyonu ..... 22

**Şekil 2. 8:** 17. kromozomda TP53 gen lokasyonu ..... 23

**Şekil 2. 9:** 6. kromozomda MYB gen lokasyonu ..... 23

**Şekil 2. 10:** 14. kromozomda IGH gen lokasyonu ..... 24

**Şekil 2. 11:** İnsan 1. kromozomunda FCRL genlerinin lokasyonu ..... 25

**Şekil 2. 12:** FCRL genlerinin yapısı ..... 26

**Şekil 4. 1:** KLL hastalarına ait 13q14.3 delesyonunu gösteren interfaz FISH görüntüsü ... 47

**Şekil 4. 2:** KLL hastalarına ait 11q22.3 ve 17p13 delesyonunu gösteren interfaz FISH görüntüsü ..... 47

**Şekil 4. 3:** KLL hastalarına ait Trizomi 12'yi gösteren interfaz FISH görüntüsü ..... 48

**Şekil 4. 4:** KLL hastalarına ait 6q23 delesyonunu gösteren interfaz FISH görüntüsü ..... 48

**Şekil 4. 5:** KLL hastalarına ait IGH breakapart interfaz FISH görüntüsü ..... 49

**Şekil 4. 6:** Fold regulation grafiği ..... 53

**Şekil 4. 7: A)** FCRL1, FCRL2 ve FCRL3 qRT-PCR Amplifikasyon Eğrisi **B)** FCRL1, FCRL2 ve FCRL3 qRT-PCR Melting Curves **C)** FCRL1, FCRL2 ve FCRL3 qRT-PCR Melting Peaks ..... 54

**Şekil 4. 8: A)** FCRL4, FCRL5 ve ZAP70 qRT-PCR Amplifikasyon Eğrisi **B)** FCRL4, FCRL5 ve ZAP70 qRT-PCR Melting Curves **C)** FCRL4, FCRL5 ve ZAP70 qRT-PCR Melting Peaks ..... 55

# SİMGELER VE KISALTMALAR

**ALP** : Alkalen Fosfataz

**ALT** : Alanin Aminotransferaz

**AST** : Aspartat Aminotransferaz

**BCL-2** : B Hücreli Lenfoma-2

**BCR** : B Hücre Antijen Reseptörü

**C11orf80** : Chromosome 11 Open Reading Frame 80

**Del** : Delesyon

**FAH** : Fumaril Asetoasetat Hidrolaz

**FCRL** : Fc Reseptör Benzeri Protein

**FISH** : Floresan In Situ Hibridizasyon

**GAA** : Asit Alfa Glikozidaz

**GNB5** : Guanin Nükleotid Bağlayıcı Protein Alt Birimi Beta-5

**Ig** : İmmünglobulin

**IgSF** : İmmünglobulin Süper Ailesi

**IgVH** : İmmunglobulin Ağır Zincir Değişken Bölge

**IL-7** : İnterlökin 7

**ILSG** : International Lymphoma Study Group

**ITAM** : İmmunreseptör Tirozin Bazlı Aktive Edici Motif

**ITIM** : İmmunreseptör Tirozin Bazlı İnhibe Edici Motif

**KLL** : Kronik Lenfositik Lösemi

**LDH** : Laktat Dehidrogenaz

**M-KLL** : IgVH Mutasyonlu KLL

**MYB** : Miyeloblastosis

**NCI-WG** : Ulusal Kanser Enstitüsü Çalışma Grubu

**NHL** : Non-Hodgkin Lenfoma

**NK** : Natural Killer

**OBSCN** : Obskurin

**PEPD** : Peptidase D

**RARS1** : Arginil-tRNA Sentetaz

**RBC** : Kırmızı Kan Hücresi

**REAL** : Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms

**SEER** : The Surveillance, Epidemiology and End Results

**SERPINF2** : Serpin Family F Member 2

**SLC7A7** : Solute Carrier Family 7 Member 7

**STRA6** : Stimulated By Retinoic Acid 6

**TAF4B** : TATA-Box Binding Protein Associated Factor 4b

**TEX14** : Testis Expressed 14

**UM-KLL** : IgVH Mutasyonsuz KLL

**VKİ** : Vücut Kitle İndeksi

**WES** : Tüm Ekzon Dizileme

**WHO** : Dünya Sağlık Örgütü

**ZAP70** : Zeta Zinciri İlişkili Protein 70

**β2-M** : Beta-2 Mikroglobulin

ζ : Zeta

# KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ HASTALARINDA FCRL GEN AİLESİ EKSPRESYON SEVİYELERİNİN IgVH MUTASYONU İLE KARŞILAŞTIRILMASI VE PROGNOZA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

## ÖZET

**Amaç:** Çalışmamızda, KLL hastalarının immünfenotipik belirteçler de (örn; ZAP70 ve CD38 vb.) kullanılarak, FISH anomalilerinin dağılımı, IgVH somatik hipermutasyon durumunun ve KLL'deki diğer prognostik faktörler ile ilişkisinin değerlendirilmesi, bununla birlikte, hastaların FCRL gen ailesi (FCRL1, FCRL2, FCRL3, FCRL4 ve FCRL5) ekspresyon seviyelerini tespit ederek diğer klinik ve biyokimyasal parametrelerle de korelasyon durumunu değerlendirdikten sonra prognoza etkisini öngörebilmek amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamıza Kasım 2021-Kasım 2023 tarihleri arasında, tedavi almayan 60 KLL hastası dahil edildi. Alınan kan örneklerinden flow sitometri ile immünfenotipik parametreler, FISH yöntemi ile del13q14, del11q22, trizomi12, del17p13, del14q32 ve del6q23 bakıldı. FCRL gen ailesi üyeleri (FCRL1, FCRL2, FCRL3, FCRL4, FCRL5) ve ZAP70 gen ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile tespit edildi. Ayrıca, immünfenotipik markerler kullanılarak belirlenen 10 hastada Tüm Ekzon Dizileme (WES) analizi ile IgVH somatik hipermutasyon durumu, patojenik ve olası patojenik varyantların tespiti yapıldı.

**Bulgular:** Çalışmamızın sonucunda, FCRL2 ve FCRL5 genlerinde istatistik olarak anlamlı bir farklılık bulundu (sırasıyla; FCRL2-FR=1,60, FCRL2-p değeri=0,033768; FCRL5-FR=1,65, FCRL5-p değeri= 0,034434). Çalışmaya dahil edilen ve WES analizi yapılan 10 hastanın 6'sında IgVH somatik hipermutasyonu tespit edilirken (M-KLL), 4'ünde IgVH somatik hipermutasyon varlığına rastlanmadı (UM-KLL). Ayrıca WES analizi sonucunda 10 hastanın 7'sinde 10 farklı patojenik varyant (RARS1, OBSCN, FAH, GAA, C11orf80, SLC7A7, PEPD, TEX14, TAF4B ve STRA6) tespit edildi. Bunların dışında 4 hastada da 4 olası patojenik varyant (AK2, SERPINF2, GNB5 ve CD36) tespit edildi.

**Sonuç:** Sonuç olarak, normal dokulardaki ekspresyonu incelendiğinde en çok lenf nodlarında eksprese edilen ve hücre yüzey sinyal reseptör yolağında yer alan FCRL2 ve FCRL5 genlerinin KLL'de iyi prognostik belirteç olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** FCRL, IgVH Mutasyon Durumu, Kronik Lenfositik Lösemi, Prognoz

# COMPARISON OF FCRL GENE FAMILY EXPRESSION LEVELS WITH IgVH MUTATION IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA PATIENTS AND INVESTIGATION OF ITS EFFECT ON PROGNOSIS

## ABSTRACT

**Aim:** In our study, we evaluated the distribution of FISH anomalies, IgVH somatic hypermutation status and its relationship with other prognostic factors in CLL, using immunophenotypic markers (e.g. ZAP70 and CD38, etc.) in CLL patients, and intended to predict its effect on prognosis after determining the FCRL gene family (FCRL1, FCRL2, FCRL3, FCRL4 and FCRL5) expression levels of the patients and evaluating the correlation with other clinical and biochemical parameters.

**Materials and Methods:** Between November 2021 and November 2023, 60 CLL patients who did not receive treatment were included in our study. From the blood samples taken, immunophenotypic parameters were examined by flow cytometry, and del13q14, del11q22, trisomy12, del17p13, del14q32 and del6q23 were examined by the FISH method. FCRL gene family members (FCRL1, FCRL2, FCRL3, FCRL4, FCRL5) and ZAP70 gene expression levels were detected by qRT-PCR. In addition, IgVH somatic hypermutation status, pathogenic and possible pathogenic variants were determined by Whole Exome Sequencing (WES) analysis in 10 patients identified using immunophenotypic markers.

**Results:** As a result of our study, a statistically significant difference was found in the FCRL2 and FCRL5 genes (FCRL2-FR=1.60, FCRL2-p value=0.033768; FCRL5-FR=1.65, FCRL5-p value = 0.034434, respectively). While IgVH somatic hyper mutation was detected in 6 of the 10 patients included in the study and examined to WES analysis (M-CLL), no IgVH somatic hyper mutation was detected in 4 (UM-CLL). Additionally, because of WES analysis, 10 different pathogenic variants (RARS1, OBSCN, FAH, GAA, C11orf80, SLC7A7, PEPD, TEX14, TAF4B and STRA6) were detected in 7 of 10 patients. Apart from these, 4 possible pathogenic variants (AK2, SERPINF2, GNB5 and CD36) were detected in 4 patients.

**Conclusion:** As a result, when their expression in normal tissues is examined, it is thought that FCRL2 and FCRL5 genes, which are mostly expressed in lymph nodes and located in the cell surface signal receptor pathway, can be considered as good prognostic markers in CLL.

**Key Words:** Chronic Lymphocytic Leukemia, FCRL, IgVH Mutation Status, Prognosis

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik lenfositik lösemi (KLL), olgun görünen malign monoklonal B hücrelerinin kemik iliği, periferik kan ve lenfoid dokularda akümülasyonu ile oluşan lenfoproliferatif bir hastalıktır (1). KLL, batı dünyasında erişkinlerde en sık görülen lösemi tipidir. 2020 yılı Ulusal Kanser Enstitüsü SEER (The Surveillance, Epidemiology and End Results) veri tabanı verilerine göre, insidansı ABD'de 4,9/100.000'dir. Erkeklerde kadınlardan 2 kat daha fazla görülür ve bu cinsiyet etkisi tüm etnik kökenlerde sabittir. Tanı anındaki ortalama yaş 70'tir (2).

Hastalığın insidansının coğrafi olarak değişkenlik göstermesi, etiyolojide genetik ve çevresel faktörlerin güçlü bir rolünün olabileceğini ortaya koymaktadır (3). KLL, klinik olarak oldukça değişken spektrumda seyredebilmektedir; Bazı hastaların tüm hastalık seyri boyunca hiç belirti ve semptomu yoktur veya minimum düzeydedir. Bu hastalar kemoterapi gerektirmeden uzun yıllar yaşayabilirken bazı hastalar da hızlı progresyon gösterebilmektedir (4). Hastaların ortalama yaşam süreleri 1-10 yıl üzeri aralığında değişmekle beraber, büyük bir kısmı 7,5-10 yıl arasında yaşamaktadır. Bu nedenle yüksek riskli hastaların belirlenmesi amacıyla hastalığın prognozunun öngörülmesi oldukça önemlidir.

Günümüzde, hastaları klinik ve laboratuvar özelliklerine dayalı olarak risk gruplarına göre sınıflandırmak için başlıca iki klinik evreleme sistemi kullanılmaktadır (5). Yaygın olarak kabul görmüş hematolojik temelli evreleme yöntemleri Rai ve Binet sistemleri, bireysel prognozu tahmin etmede kullanılmaktadır. Ancak bu evreleme sistemlerinin prognostik değeri, erken evre hastalığı olmasına rağmen daha hızlı ilerleme riski olan KLL hastalarının bir kısmını belirlemede yetersiz kalmaktadır (6). Bu amaçla bu evreleme sistemlerine ek olarak günümüzde progresyon riski taşıyan KLL hastalarını belirlemede başka birçok belirteç kullanılmaktadır. Bunlar; immünglobulin ağır zincir değişken bölgesinin (IgVH) somatik hipermutasyon durumu, ZAP70 (zeta zinciri ilişkili protein 70) ve CD38 düzeyi, kromozomal anomaliler (del13q14, del11q22, del17p13, trizomi 12, del6q23 ve del14q32), β-2 mikroglobulin (β2-M) ve laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyleri, klinik evreleme ve kemik iliği infiltrasyon paterni gibi faktörlerdir (7).

KLL hastalarının yaklaşık yarısında IgVH somatik hipermutasyonu tespit edilmiştir. IgVH mutasyonu olmayan olguların pregerminal lenfositlerden kaynaklandıkları ve daha agresif bir hastalık, yüksek riskli sitogenetik ve kötü sonuç sergilediği, mutasyonlu olgularda ise hastalığın postgerminal lenfositlerden kaynaklandığı, hastalık seyrinin daha yavaş ve sağ kalımında daha uzun olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Ancak bu tür gen mutasyonlarının tespiti rutin uygulamada çalışılmamaktadır (8,9). Bu nedenle IgVH mutasyon durumunu tespit etmede kullanılacak biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. KLL olgularında gen ekspresyonlarındaki farklılıkların belirlenmesi, bunların moleküler belirteç olarak kullanılmasında etkilidir.

FCRL (Fc reseptör benzeri protein) molekülleri, potansiyel aktive ve inhibe edici rollere sahip immünoglobulin süper ailesine (IgSF) aittir (10). FCRL genleri 1q21-23 kromozom lokusunda bulunur. İnsanlarda bu aile, altı transmembran reseptörü (FCRL1-6) ve transmembran bölgesi içermeyen FCRLA ve FCRLB dahil olmak üzere iki sitoplazmik proteini kodlar. FCRL gen ailesi üyeleri, tirozin bazlı immün düzenleyici potansiyele sahiptir (11,12). FCRL gen ailesi üyelerinin B-hücresi sinyalini pozitif ve/veya negatif bir şekilde etkilediği ve dolayısıyla doğuştan gelen ve adaptif hümoral bağışıklığı düzenleme işlevi görebileceği düşünülmektedir. Sitoplazmik bölgelerinde immün reseptör tirozin bazlı aktive edici/inhibitör motiflerin (ITAM/ITIM) varlığı nedeniyle, bu moleküllere bazı immün modülatör roller atfedilmiştir. Aktive edici ve/veya inhibe edici sinyaller iletme potansiyelleri, bu reseptörlerin hücresel farklılaşmayı düzenlemede ve B hücresi yanıtlarının başlatılmasını ve sonlandırılmasını modüle etmede bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (13).

Çalışmamızın amacı; Hematoloji polikliniğine başvuran, Hematoloji Uzmanı tarafından 3 ayda bir değerlendirilen ve tedavi almayan 18 yaşından büyük KLL hastalarının immünfenotipik belirteçler de (örn; ZAP70 ve CD38 vb.) kullanılarak, FISH anomalilerinin dağılımı, IgVH somatik hipermutasyon durumunun ve KLL' deki diğer prognostik faktörler ile ilişkisinin değerlendirilmesi, bununla birlikte, hastaların FCRL gen ailesi (FCRL1, FCRL2, FCRL3, FCRL4 ve FCRL5) ekspresyon seviyelerini tespit ederek diğer klinik ve biyokimyasal parametrelerle de korelasyon durumunu değerlendirdikten sonra prognoza etkisini öngörebilmektir.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. LENFOMALAR VE B HÜCRELİ NEOPLAZMLAR

Lenfomalar, olgunlaşmanın farklı aşamalarında lenfositlerin B-hücresi, T-hücresi ve doğal öldürücü (NK) hücre alt kümelerinin klonal çoğalmasından kaynaklanan heterojen bir malignite grubudur (14). Köken alınan farklılaşma aşamalarına göre değişik immünolojik, morfolojik ve klinik tablo oluştururlar. Lenfomaların sınıflandırılması hastalığın doğru teşhis edilmesi ve tedaviye yaklaşımı yönünden oldukça önemlidir.

1970 yılından önce, lenfomaların tamamen morfolojik odaklı tanımlayıcı sınıflandırılması önerilmiştir. Rappaport önerisi (1966) klinik açıdan anlamlı ilk sınıflandırma olmuştur. Rappaport, lenfomaları küçük ve büyük hücreler ile foliküler (veya nodüler) ve yaygın büyüme modellerine göre alt bölümlere ayırmıştır (15).

1960'lı ve 1970'li yıllardaki immünolojik gelişmeler, bağışıklık sistemi ve lenfomaların anlaşılmasında etkili olmuştur. Birkaç lenfoid soyunun varlığı keşfedilmiştir. Monoklonal antikorlar ve immün etiketleme teknikleri kullanılarak lenfoma hücrelerinin fenotipinin belirlenmesi mümkün hale gelmiştir. Kısa sürede lenfoma hücrelerinin normal lenf düğümü hücreleriyle yakından ilişkili olduğu ve non-Hodgkin lenfoma hücrelerinin (NHL'ler), normal lenfositlerin, özellikle de folikül merkezindeki B hücrelerinin sitolojisini özetlediği ortaya çıkmıştır (16).

Kiel Sınıflandırması, Almanya'da Karl Lennert tarafından geliştirilmiştir ve Avrupa'da yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Öncelikle nodal hastalıkların sınıflandırılmasını amaçlayan bu yaklaşımda, lenfomalar, B ve T lenfosit farklılaşmasının varsayımsal şemasına göre sınıflandırılmıştır. Önceden belirlenmiş klinik davranışlardan ziyade sitolojik özelliklerine göre ve diğer tümörler için belirlenmiş şemalara uygun olarak lenfomalar düşük dereceli ve yüksek dereceli olarak adlandırılmıştır (17,18).

1991 yılında Peter Isaacson ve Harald Stein, Uluslararası Lenfoma Çalışma Grubu (ILSG)'nu kurmuştur. 1994 yılında, ILSG tarafından “Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms” (REAL) adıyla bir lenfoid neoplazmlar listesi yayınlamıştır (19). Yayınlanan REAL sınıflandırmasında farklı lenfomalar, morfoloji, immünfenotip, genetik özellikler, klinik özellikler ve türettikleri normal hücre karşılığı

olmak üzere beş özelliğin birleşimiyle tanımlanmıştır. Bu özelliklerin her hastalık varlığının sınıflandırılmasına katkı derecesi değişkendir.

REAL sınıflandırmasından sonra Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Avrupa ve Amerika Hematopatoloji Derneklerini "mavi kitap" serisi için hematopoetik ve lenfoid neoplazmların sınıflandırmasını sağlamak üzere görevlendirilmiştir. REAL sınıflandırmasında geliştirilen hastalık tanımı ve fikir birliği ilkeleri esasen korunmuştur. 2001 yılı sonunda yayınlanan WHO lenfoma sınıflandırması Hematolojik malignitelerin sınıflandırılmasına ilişkin ilk gerçek uluslararası fikir birliğini temsil etmiştir ve araştırmacılar için referans olarak dünya çapında kabul görmüştür (20).

Hematopoetik ve lenfoid doku tümörlerinin 2001'de yayınlanan ve 2008'de güncellenen WHO hematopoetik ve lenfoid dokuların neoplazmları sınıflandırması, klinik, immünolojik ve genetik veriler göz önüne alınarak oluşturulmuştur (21). 2016 yılında revize edilmiş Dünya Sağlık Örgütü (WHO) lenfoid neoplazm sınıflandırması (Tablo 2.1), epigenetik profiller, mutasyonel özellikler gibi son birkaç yılda yapılan birçok yeni nesil dizileme çalışmasından elde edilen yeni klinik ve genetik veriyi içermektedir (22).

**Tablo 2. 1:** 2016 WHO sınıflandırmasına göre B hücreli neoplazmlar

| **Olgun B Hücreli Neoplazmlar** |
|---|
| Kronik lenfositik lösemi/Küçük lenfositik lenfoma |
| Monoklonal B hücreli lenfositoz |
| B hücreli prolenfositik lösemi |
| Splenik marjinal zon lenfoması |
| Tüylü hücreli lösemi |
| Sınıflandırılamayan splenik B hücreli lenfoma/lösemi |
| Dalak diffüz kırmızı pulpa küçük B hücreli lenfoma |
| Tüylü hücreli lösemi varyantı |
| Lenfoplazmositik lenfoma |
| Waldenström makroglobulinemisi |
| Önemi belirlenemeyen monoklonal gamopati (MGUS), IgM |
| μ ağır zincir hastalığı |
| γ ağır zincir hastalığı |
| α ağır zincir hastalığı |
| Önemi belirlenemeyen monoklonal gamopati (MGUS), IgG/A |
| Plazma hücreli miyelom |
| Kemiğin soliter plazmasitoması |
| Ekstraosseöz plazmasitoma |
| Monoklonal immünoglobulin depo hastalıkları |
| Mukoza ile ilişkili lenfoid dokunun ekstranodal marjinal zon lenfoması (MALT lenfoma) |
| Nodal marjinal bölge lenfoması |
| Pediatrik nodal marjinal bölge lenfoması |
| Foliküler lenfoma |

**Tablo 2.1** (devam)

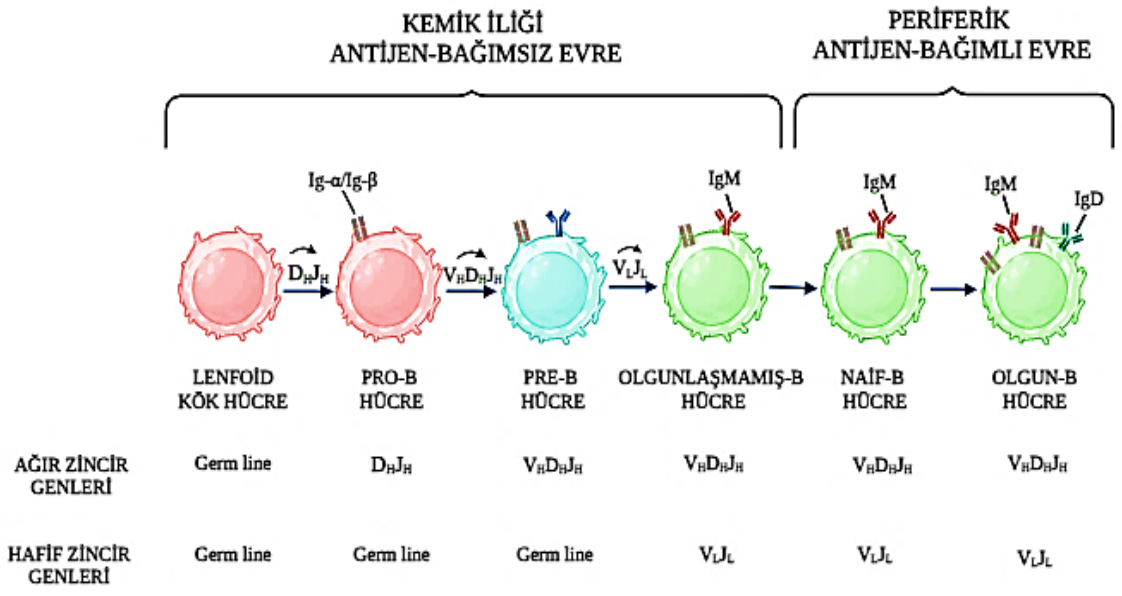
| |
|---|
| Yerinde foliküler neoplazi |
| Duodenal tip foliküler lenfoma |
| Pediatrik tip foliküler lenfoma |
| IRF4 yeniden düzenlemeli büyük B hücreli lenfoma |
| Primer kutanöz folikül merkezi lenfoması |
| Mantle hücreli lenfoma |
| Yerinde mantle hücreli neoplazi |
| Diffüz büyük B hücreli lenfoma (DLBCL), NOS |
| Germinal merkez B hücre tipi |
| Etkinleştirilmiş B hücre tipi |
| T hücreli/histiyosit bakımından zengin büyük B hücreli lenfoma |
| Merkezi sinir sisteminin (CNS) birincil DLBCL'si |
| Birincil kutanöz DLBCL |
| EBV $^{+}$ DLBCL, NOS– |
| EBV $^{+}$ mukokutanöz ülser |
| Kronik inflamasyonla ilişkili DLBCL |
| Lenfomatoid granülomatöz |
| Primer mediastinal (timik) büyük B hücreli lenfoma |
| İntravasküler büyük B hücreli lenfoma |
| ALK + büyük B hücreli lenfoma |
| Plazmablastik lenfoma |
| Primer efüzyon lenfoması |
| HHV8 $^{+}$ DLBCL, NOS$^{-}$ |
| Burkitt lenfoması |
| 11q aberasyonlu Burkitt benzeri lenfoma |
| MYC ve BCL2 ve/veya BCL6 yeniden düzenlemelerine sahip yüksek dereceli B hücreli lenfoma |
| Yüksek dereceli B hücreli lenfoma, NOS– |
| Sınıflandırılamayan B hücreli lenfoma, DLBCL ile klasik Hodgkin lenfoma arasında orta düzeyde özelliklere sahip lenfoma |

## 2.2. B LENFOSİTLERİN GELİŞİMİ

Konağın bağışıklık yanıtı, doğal ve adaptif (edinsel, kazanılmış) bağışıklık aşamalarından oluşur. Doğal bağışıklık, enfeksiyonlara karşı konağın savunmasındaki ilk koruyucu basamaktır. Adaptif bağışıklık ise, doğal bağışıklıktan daha geç devreye giren ve etkili koruma sağlayan bağışıklık sistemidir. Doğuştan gelen bağışıklık yanıtında yer alan hücreler makrofajlar, dentritik hücreler, mast hücreleri, nötrofiller, eozinofiller ve NK hücreleridir. Adaptif bağışıklık ise, esas olarak T ve B lenfositlerinin farklı antijenlere karşı spesifik ve seçici olarak yanıt verme yeteneğine dayanır (23).

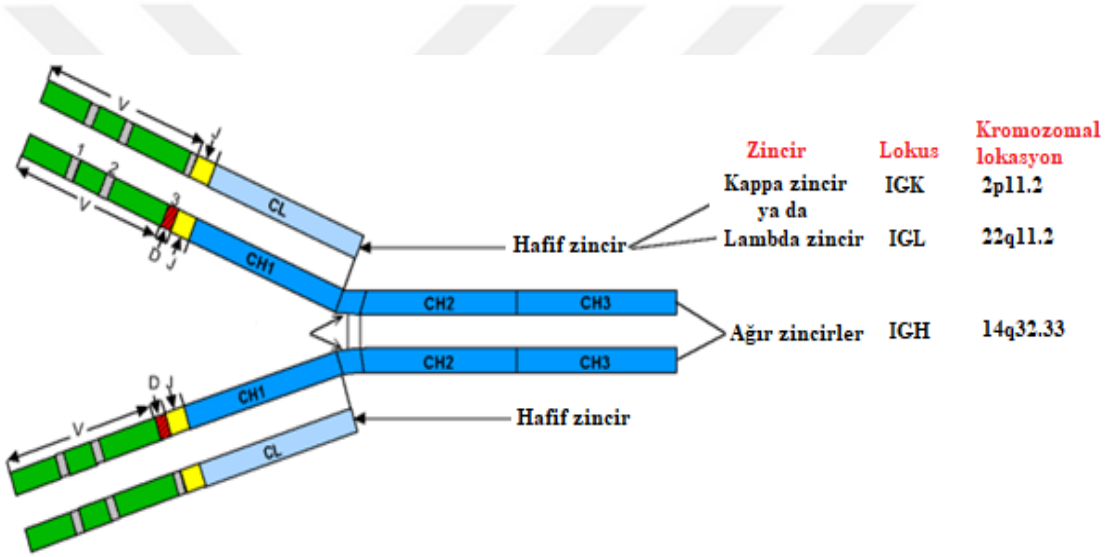
B lenfositlerin gelişimi (Şekil 2.1) alınan farklı uyaranlara bağlı olarak B lenfositleri üretecek olan birincil lenfoid dokularda (karaciğer veya kemik iliği) bulunan hematopoetik kök hücrelerden başlar. B hücrelerinin gelişimi, esas olarak IL-7 ve FLT3-L'yi üreten kemik iliği stromal hücrelerine ve IKAROS, E2A, EBF, PAX5 ve IRF8 gibi

çeşitli transkripsiyon faktörlerinin etkisine bağlıdır (24). Kemik iliğindeki kök hücreler IL-7 etkisiyle pro-B hücreleri adı verilen öncül B hücreleri oluşturmaya başlar. Bu aşamada B hücre reseptörü (BCR) henüz gelişmemiştir. BCR yerine sinyal iletici alt üniteler olarak Igα (CD79a) ve Igβ (CD79b) heterodimerleri eksprese edilir (25). Kemik iliğinde B hücreleri, antijen özgüllüğünü kazandıkları birkaç farklı gelişim aşamasından geçer. Bu sırada, diferansiyel yüzey antijen ekspresyonu ve sıralı ağır ve hafif zincir gen yeniden düzenlemesini takip ederek hücre olgunlaşma aşamasını belirleyen BCR'yi (başlangıçta IgM) oluştururlar. Olgunlaşmamış aşamaya ulaşan B hücreleri, kemik iliğinden çıkar ve gelişimlerini olgun veya saf aşamaya kadar tamamlar; bu, hücre yüzeyinde IgM'ye ek olarak IgD'nin ortaya çıkmasıyla sinyallenir. Bu gelişim dizisi, antijenden bağımsız B hücresi gelişimi olarak bilinen bir aşama olan, eksojen antijen ile herhangi bir temasın yokluğunda gerçekleşir (24,26). Geç ya da antijen bağımlı evrede, antijenle karşılaşan B hücreleri ikincil lenfoid dokuların germinal merkezlerinde toplanır ve bir dizi genetik değişiklikle (klonal ekspansiyon, Ig ağır zincir rekombinasyonu, IgVH somatik hipermutasyonu, BCR afinite seleksiyonu) antikor sentezleyebilen B hücreleri veya bellek hücrelerine dönüşürler (27,28).




**Şekil 2. 1:** B lenfositlerin gelişimi

H ve L zincirlerinin değişken kısımları (V) yan yanadır ve immünglobulin molekülünün antijen bağlama kısmını oluştururlar (29). V bölgeleri, molekülün antijen bağlama alanını üreten, oldukça değişken üç alt bölge veya hiper değişken sekans içerir. Zincirlerin amino-terminal kısımları, bir antikor molekülünden diğerine amino asit sekansında değişiklik gösterir. Karboksil terminal kısımları, antikorun her bir alt sınıfında sabittir. H zinciri sabit bölgeleri, molekülün Fc alanını oluşturur ve immünglobulin molekülünün efektör fonksiyonlarının çoğundan sorumludur. Her polipeptid zinciri bir değişken ve bir sabit bölgeden oluşur (Şekil 2.2). Değişken bölge antijen tanımakla görevli iken, sabit bölge immünglobulin (Ig) izotipini belirler ve efektör işlevlerden sorumludur (30).




**Şekil 2. 2:** İmmünglobulin yapısı (Lefranc, M. P., & Lefranc, G. 2020'dan değiştirilerek alınmıştır) (31).

BCR, birbirine disülfid bağlarla bağlanmış iki hafif zincir (L) (25 kd) ve iki ağır zincir (H) (50 kd) içeren heterodimer bir yapıdır. Hafif ve ağır zincir lokuslarının her biri, V (variable), D (diversity) (yalnızca ağır zincir geni için), J (joining) ve C (constant) segmentinden oluşur. Ağır zincirler (H), 4 segmentten (VH, D, JH ve CH) ve hafif zincirler (L) 3 segmentten (VL, JL ve CL) oluşur. 9 farklı ağır zincir tipi (IgM, IgD, IgG1–4, IgA1-2 ve IgE) ve 2 hafif zincir tipi ($\kappa$ veya $\lambda$) için genler bulunur. Ağır zincir genleri kromozom 14 üzerindedir ve hafif zincir genleri ise sırasıyla kromozom 2 ve 22 üzerindedir.

## 2.3. KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ

### 2.3.1. Tanım

Kronik lenfositik lösemi (KLL), kan, kemik iliği ve ikincil lenfoid dokularda küçük, olgun görünen neoplastik lenfositlerin birikimiyle karakterize edilen ve lenfositoz, kemik iliğinde lösemi hücre infiltrasyonu, lenfadenopati ve splenomegali ile sonuçlanan $CD5^+$ B hücrelerinin bir malignitesidir (32). KLL'nin genel olarak, antijenler ve/veya hücre otonom BCR etkileşimleri tarafından üretilen ve BCR sinyalleri tarafından desteklenen klonal olgun bir B lenfositin büyümesinden kaynaklandığına inanılmaktadır (33).

Dünya Sağlık Örgütü Lenfoid Neoplazm Sınıflandırması Güncellemeleri ve Uluslararası Konsensüs Sınıflandırması Klinik Danışma Komitesi (International Consensus Classification Clinical Advisory Committee), KLL'yi periferik dolaşımda CD5, CD19, CD20 ve CD23 eksprese eden $\geq 5\times10^9$/L klonal B-hücreleri olan düşük dereceli lenfoproliferatif neoplazm olarak tanımlamaktadır (34,35).

### 2.3.2. Epidemiyoloji

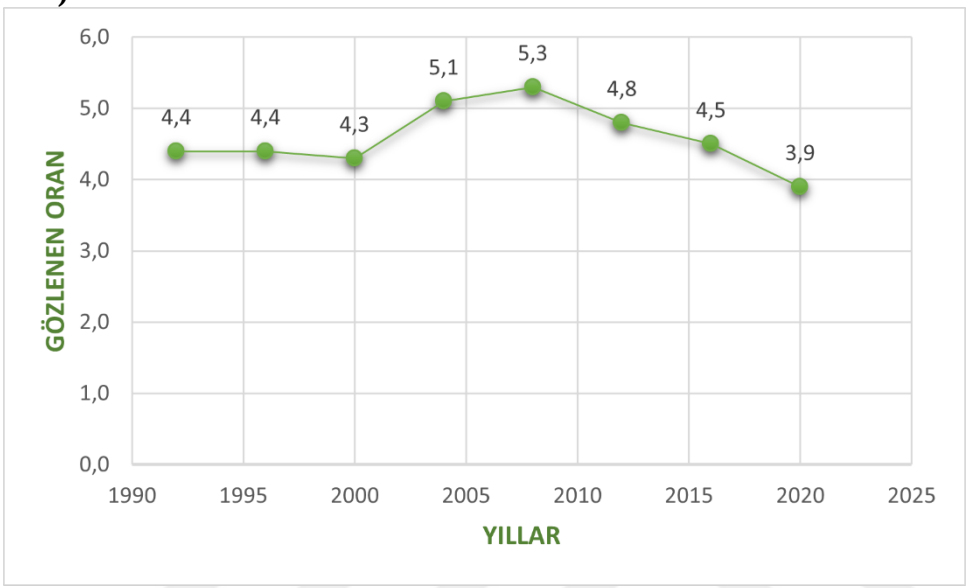
Olgun monoklonal B hücrelerinin anormal proliferasyonu ile karakterize edilen KLL, tüm lösemi vakalarının %30'unu ve tüm hematolojik malignitelerin %11'ini oluşturan, batı dünyasında yetişkinlerde en sık görülen lösemi tipidir (36).

SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) veritabanı 2020 verilerine göre, her yıl ABD'deki tüm yeni kanser vakalarının %1'ini ve tüm kanser ölümlerinin %0,7 'sini temsil etmektedir. Hastalığın yıllık insidans oranı 4,9/100.000'dir. Yeni kronik lenfositik lösemi vakalarının oranı yılda 100.000 erkek ve kadında 4,6' dır. Ölüm oranı ise yılda 100.000 erkek ve kadında 1,1' dir (Şekil 2.3) (2). Asya ülkelerinde, batı ülkelerine kıyasla KLL insidansının 10 kat daha düşük olduğu tahmin edilmektedir (37,38). Tüm dünyada her yıl yaklaşık 191.000 yeni vaka ortaya çıkmaktadır ve yaklaşık 61.000 kişi KLL nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Erkeklerde görülme sıklığı kadınlara oranla yaklaşık 2 kat daha fazladır (2).

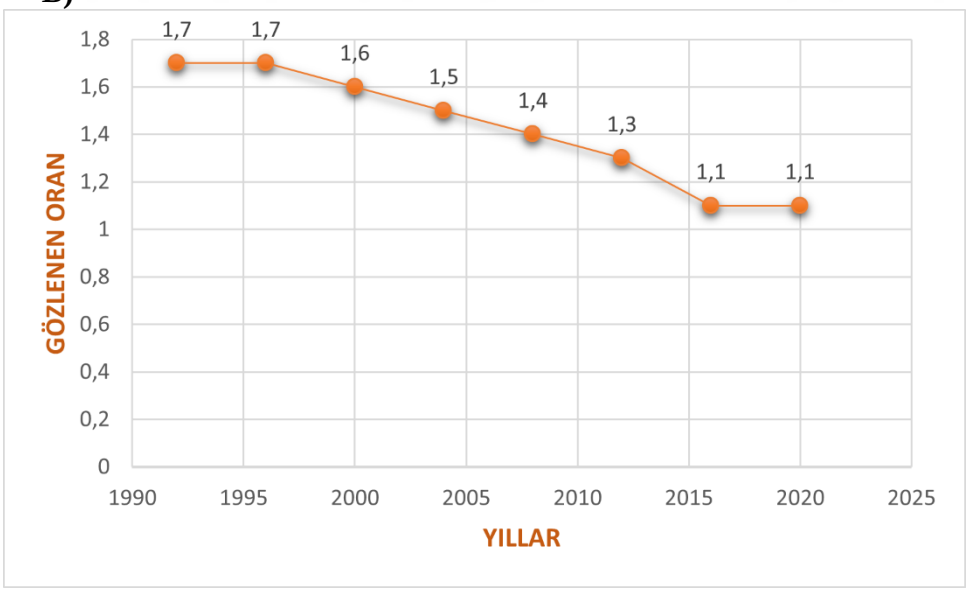
KLL'nin en sık görüldüğü yaş aralığı 65-74 olmakla birlikte ortanca tanı yaşı 70'tir. SEER verilerine göre, KLL'li hastaların ortanca ölüm yaşı 82 ve ölümlerin yaklaşık

%72,7'si de 75 yaşından sonra meydana gelmektedir. Klinik tabloların spektrumu, hastalığın tedavi gerektirmeyen sessiz formundan hızla ilerleyen formuna değişse de çoğu hasta, yaklaşık %88'lik 5 yıllık sağkalım ile olumlu bir prognoza sahiptir (2).

**A)**




**B)**




**Şekil 2. 3: A)** Yıllara göre yeni vaka oranları **B)** Yıllara göre ölüm oranları (2)

### 2.3.3. Etiyoloji

**2.3.3.1. Genetik yatkınlık:** Asya ülkelerinde, batı ülkelerine kıyasla KLL insidansının daha düşük olduğu tahmin edilmektedir. Bu popülasyonlarda KLL insidansının düşük olması, çevresel risk faktörlerinden ziyade genetik risk faktörlerinin hastalığın etkeni olabileceğini öne sürmektedir (37,38).

Ailesel KLL, iki veya daha fazla birinci derece akrabanın KLL hastalığına sahip olması olarak tanımlanmıştır. Ailede KLL öyküsünün olması en iyi tanımlanmış risk faktörüdür. KLL hastalarının yaklaşık %12'sinde bilinen bir lenfoproliferatif hastalık (LPD) aile öyküsü vardır ve %6-9'unda KLL'li bir aile üyesi vardır. Aile üyelerinde monoklonal B hücreli lenfositoz insidansının arttığı görülmektedir (39).

**2.3.3.2. Sigara:** Tütüne maruz kalma ile KLL riski arasındaki ilişki tartışmalıdır. Yapılan çalışmalara göre sigara içmenin KLL riskini arttırmadığı bildirilmektedir (40,41).

**2.3.3.3. Vücut kitle indeksi:** Vücut kitle indeksi (VKİ) $\geq 25$, bağıl riskle KLL'nin yanı sıra B hücreli lenfoma insidansında artışla ilişkilidir. Asyalılar, ağırlıklı olarak Avrupa kökenli kişilere göre daha düşük bir ortalama VKİ'ye sahiptirler. İki büyük popülasyona dayalı bir çalışmada, besin alımı ile KLL arasında herhangi bir ilişki olmadığı bildirilmiştir (42).

**2.3.3.4. Çevresel ve diğer etmenler:** Ağırlıklı olarak Avrupa kökenli kişilerde KLL vakalarında bazı kimyasallar, herbisitler, benzen ve diğer aromatik hidrokarbonlar ve iyonlaştırıcı radyasyonlar dahil olmak üzere bazı çevresel risk faktörleri rapor edilmiştir (40,41). Bunlara ek olarak diğer risk faktörleri arasında atopik koşullar (düşük risk), eğlence amaçlı güneşe maruz kalma (düşük risk), hepatit-C virüsü seropozitifliği (HCV; daha yüksek risk), ailede hematolojik malignite öyküsü (daha yüksek risk), çiftlikte yaşamak/çalışmak (daha yüksek risk), kuaför olarak çalışmak (daha yüksek risk) ve kırmızı kan hücresi (RBC) nakli (daha yüksek risk) yer alır. Ancak bu değişkenlerin hiçbiri Asyalılardaki KLL riskini açıklamamaktadır (43).

### 2.3.4. Klinik

**2.3.4.1. Tanı:** NCI-WG (National Cancer Institute-sponsored Working Group) tarafından yayınlanan KLL tanı kriterleri (44) aşağıdaki gibidir;

- Periferik kanda>5.000/$mm^3$ monoklonal B lenfositoz varlığı gerekir. Dolaşımdaki B lenfositlerin klonalitesinin flow sitometri ile doğrulanması gereklidir.
- Periferik yaymada bulunan lösemi hücreleri, karakteristik olarak küçük, olgun, dar sitoplazmalı, ayırt edilebilir nükleolusları olmayan ve kısmen toplanmış kromatin içeren yoğun bir nükleusa sahip lenfositlerdir. Bu hücreler, daha büyük veya atipik hücreler, bölünmüş hücreler veya prolenfositlerle karışmış halde bulunabilir. Bu oran %55'i aşmamalıdır.
- KLL hücreleri, T hücresi antijeni CD5 ve B hücresi yüzey antijenleri CD19, CD20 ve CD23'ü birlikte eksprese eder. Yüzey immünglobulin, CD20 ve CD79b seviyeleri, normal B hücreleri ile karşılaştırıldığında daha düşük eksprese edilir. Lösemi hücrelerinin her bir klonu, kappa veya lambda immünglobulin hafif zincirlerinden birini taşır.

**2.3.4.2. Evreleme:** KLL'de hastaların klinik seyrini ve bireysel prognozu tahmin etmede yaygın olarak kabul gören iki klinik evreleme sistemi bulunmaktadır. Bunlar hematolojik temele dayalı evreleme yöntemleri olan Rai ve Binet sistemleridir (45,46).

Rai evrelemesi, ilk kez 1975 yılında Rai ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur. Daha sonra 1987 yılında prognostik grup sayısını beşten üçe düşürecek şekilde modifiye edilmiştir (47). Her iki sistem de farklı klinik sonuçları olan üç ana prognostik grubu tanımlamaktadır. Bu iki evreleme sistemi basit, ucuz ve fizik muayene ile standart laboratuvar testlerine dayalıdır. Ultrason, bilgisayarlı tomografi veya manyetik rezonans görüntüleme gerektirmezler (48).

Rai evreleme sistemi, düşük riskli hastalığı, kanda ve/veya kemik iliğinde lösemi hücreleri ile birlikte lenfositozu olan hastalar olarak tanımlar (lenfoid hücreler> %30) (eski Rai evre 0). Lenfositozu, herhangi bir bölgede büyümüş nodları, splenomegali ve/veya hepatomegalisi olan hastalar, orta riskli hastalığa (önceden Rai evre I veya evre

II olarak kabul ediliyordu) sahip olarak tanımlanır. Yüksek riskli hastalar, hastalıkla ilişkili anemisi (hemoglobin [Hb] düzeyinin 11 g/dL'den düşük olması) (eski adıyla evre III) veya trombositopenisi (trombosit sayısının $100x10^9$/L'nin altında olması) olan hastaları içerir (eski adıyla evre IV) (Tablo 2.2) (47).

**Tablo 2. 2:** Modifiye Rai evrelemesi

| Evre | Klinik | Ortalama Sağkalım (Yıl) |
|---|---|---|
| **Düşük Risk** | | |
| Rai 0 | Lenfositoz > 15.000/$mm^3$ | >10 |
| **Orta Risk** | | |
| Rai I | Lenfositoz ve lenfadenopati | >8 |
| Rai II | Lenfositoz ve hepatomegali ve/veya splanomegali ± lenfadenopati | |
| **Yüksek Risk** | | |
| Rai III | Lenfositoz ve Hb <11 gr/dL ± lenfadenopati/organomegali | 6,5 |
| Rai IV | Lenfositoz ve trombosit <100.000 $mm^3$ ± lenfadenopati/organomegali | |

Binet evreleme sistemi, çapı 1 cm'den büyük lenf düğümlerinin varlığı veya organomegali ile tanımlanan ilgili alanların sayısına ve anemi veya trombositopeni olup olmadığına dayanmaktadır. Binet evreleme sistemi, hastaları A, B ve C olmak üzere üç kategoriye ayırır. Evre A ve B'nin her ikisinde de hemoglobin sayısı ≥10 g/dL ve trombosit sayısı ≥100/L'dir, ancak lenfadenopatinin karakterizasyonu farklıdır. Evre A'da <3 genişlemiş alan bulunurken, Evre B'de ≥3 genişlemiş alan vardır. Evre C, lenfadenopatiden bağımsız olarak hemoglobin sayısının <10 g/dL ve trombosit sayısının <100.000/$mm^3$ olması ile karakterize edilir (Tablo 2.3) (46).

**Tablo 2. 3:** Binet evrelemesi

| Evre | Klinik | Ortalama Sağkalım (Yıl) |
|---|---|---|
| Binet A | Hb ≥10 gr/dL, trombosit ≥100.000/$mm^3$, <3 lenfatik bölgede tutulum | >10 |
| Binet B | Hb ≥10 gr/dL, trombosit ≥100.000/$mm^3$, ≥3 lenfatik bölgede tutulum | >8 |
| Binet C | Hb <10 gr/dL, trombosit <100.000/$mm^3$ | 6,5 |

Moleküler genetik alanındaki son gelişmeler ile Rai ve Binet evreleme sistemleri, KLL'de prognostik sınıflandırmayı kapsamlı bir şekilde karakterize etmek için yeterli değildir (49). Günümüzde, klinik ve laboratuvar temelli bu iki evreleme sisteminin yanında genetik verileri de içeren yeni bir sınıflandırma sistemi kullanılmaya başlanmıştır. Bu sınıflandırma sisteminde klinik aşamadan bağımsız olarak prognostik bilgi sağlayan çok sayıda potansiyel belirteç mevcuttur. Bu sınıflandırmada, klinik olarak anlamlı birkaç temel prognostik parametre oluşturmak için klinik, biyolojik ve genetik bilgiyi birleştiren kapsamlı skorlar oluşturulmuştur (50).

Kronik lenfositik lösemi-Uluslararası Prognostik İndeks (KLL-IPI) olarak adlandırılan bu yeni sınıflandırmada 5 bağımsız prognostik faktörden oluşan ağırlıklı bir derecelendirme kullanılır. Bunlar; yaş, klinik evre, serum β2-M düzeyi, immünglobulin ağır zincir değişken bölgesi (IgVH) mutasyon durumu ve TP53 delesyonu ve/veya mutasyonu (TP53 disfonksiyonu)'dur. KLL-IPI sistemine göre risk grupları 4 farklı kategoride değerlendirilir (Tablo 2.4). Risk gruplarının 5 yıllık toplam sağkalım oranları değişkenlik göstermektedir (Tablo 2.5) (51).

**Tablo 2. 4:** KLL-IPI sistemi

| | |
|---|---|
| **Yaş** | ≤65: 0 puan<br>>65: 1 puan |
| **Klinik evre** | Binet A/Rai 0: 0 puan<br>Binet B-C/Rai I-IV: 1 puan |
| **β2 mikroglobulin düzeyi (mg/L)** | ≤3,5: 0 puan<br>>3,5: 2 puan |

**Tablo 2.4** (devam)

| | |
|---|---|
| **IgVH mutasyon durumu** | Var: 0 puan<br>Yok: 2 puan |
| **Del (17p) ve/veya P53 mutasyonu** | Yok: 0 puan<br>Var: 4 puan |
| **≥7 puan: Çok yüksek risk**<br>**4-6 puan: Yüksek risk**<br>**2-3 puan: Orta dereceli risk**<br>**≤1 puan: Düşük risk** | |

**Tablo 2. 5:** KLL-IPI sistemi risk grupları ve sağkalım oranları

| **KLL-IPI Skoru** | **5 Yıllık Toplam Sağkalım (%)** |
|---|---|
| Düşük risk | 93,2 |
| Orta dereceli risk | 79,3 |
| Yüksek risk | 63,3 |
| Çok yüksek risk | 23,3 |

**2.3.4.3. Tedavi:** KLL tedavisi yalnızca aktif, semptomatik hastalığı olan kişilere verilmelidir. Erken evre ve asemptomatik hastalığı olan kişilerde tedavi uygulamanın bir faydası görülmemiştir. KLL hastalığının tedavi edilebilir olmaması, hastaların genellikle ileri yaşta olması ve hastalığın yavaş seyirli olması nedeniyle asemptomatik erken evrede olan hastalar tedavi edilmemelidir. NCI-WG kılavuzlarına göre aktif hastalığın özellikleri arasında ateş, kilo kaybı ve gece terlemesi, lenfadenopati, splenomegali veya hepatomegalinin semptomları veya komplikasyonları, otoimmün fenomenin neden olmadığı sitopeniler ve altı aydan kısa bir lenfosit ikiye katlanma süresi yer alır (52).

Asemptomatik Rai evre 0-II veya Binet evre A-B'ye sahip hastalar için standart tedavi, hastalar semptomatik olana kadar ‘bekle ve gör’ stratejisi kullanmak ve kan tahlilini her 3-12 ayda bir izlemektir. Semptomatik Rai evre III-IV veya Binet evre C’ye sahip hastalar için daha agresif tedavi rejimlerinden faydalanılır. Hastalığın daha fazla

ilerlediği hastalarda kullanılan diğer tedaviler arasında sitotoksik ilaçlar ve monoklonal antikorlar yer alır. KLL tedavisine tek kemoterapötik ajanlar, monoklonal antikorlar, BCR, BCL-2 ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) inhibitörleri gibi birkaç ana bileşen eklenebilir (Şekil 2.4) (52-54).




**Şekil 2. 4:** KLL birinci basamak tedavi algoritması (54)

### 2.3.5. KLL'de Prognoz ve Sağkalımı Etkileyen Faktörler

KLL, heterojen klinik seyirli bir hastalıktır; Bazı hastalar tüm hastalık seyri boyunca hiç belirti ve semptom göstermeden uzun yıllar yaşayabilirken bazı hastalar hızlı progresyon gösterebilmektedir (4). Hastaların ortalama yaşam süreleri 1-10 yıl üzeri aralığında değişmekle beraber, büyük bir kısmı 7,5-10 yıl arasında yaşamaktadır. Bu nedenle yüksek riskli hastaların belirlenmesi amacıyla hastalığın prognozunun öngörülmesi oldukça önemlidir. Günümüzde progresyon riski taşıyan hastaları belirlemede bazı belirteçler kullanılmaktadır. Bunlar; immünglobulin ağır zincir değişken bölgesinin (IgVH) somatik hipermutasyon durumu, ZAP70 (zeta zinciri ilişkili protein 70) ve CD38 düzeyi, kromozomal anomaliler (del13q14, del11q22, del17p13, trizomi 12,

del6q23 ve del14q32), β-2 mikroglobulin (β2-M) ve laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyleri, klinik evreleme ve kemik iliği infiltrasyon paterni gibi faktörlerdir (7).

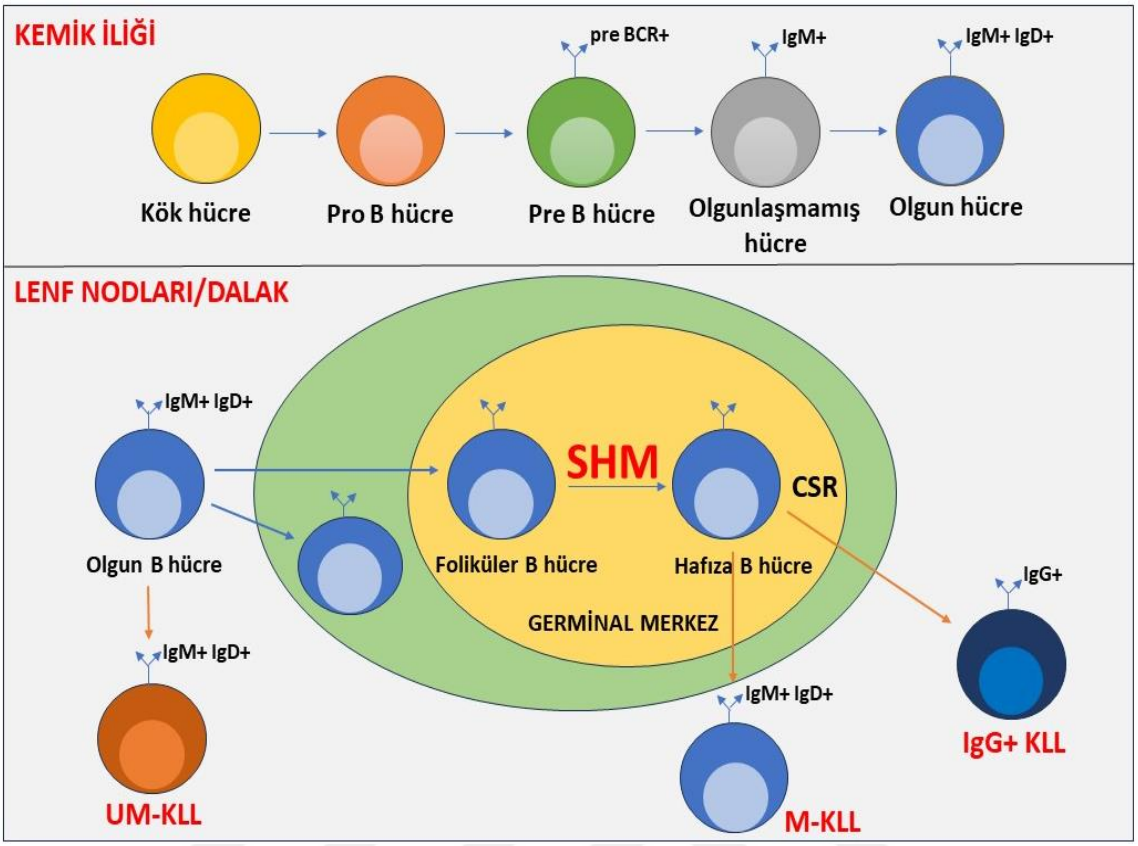
**2.3.5.1. IgVH somatik hipermutasyon durumu:** Somatik hipermutasyonlar (SHM), ikincil lenfoid organların (dalak ve lenf bezleri) germinal merkezlerinde B hücresi olgunlaşması sırasında ortaya çıkar. Antijene bağımlı farklılaşma aşamaları sırasında spesifik olarak immünglobulin yeniden düzenlenmiş VJ ve VDJ genlerini etkiler ve antikorların değişken alanlarının çeşitliliğinin üretilmesi için önemli bir mekanizmayı temsil eder. Bu somatik hipermutasyon süreci, yeniden düzenlenmiş VH ve VL (V-kappa veya V-lambda) dizilerinde yüksek oranda nokta mutasyonlarının eklenmesini içerir (55). B hücrelerinde ifade edilen diğer genler, somatik hipermutasyon mekanizmaları tarafından değiştirilmez. SHM, bir B hücresinde tahminen baz başına 1/1000 sıklıkta meydana gelir; bu, diğer hücrelerdeki spontan mutasyonların oranından kabaca $10^6$ kat daha fazladır. Somatik hipermutasyon, sınıf değiştirme rekombinasyonu (CSR) ile ortak mekanizmalara sahiptir: her ikisi de tek sarmallı DNA'yı hedeflemek için transkripsiyonu gerektiren aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz (AICDA, AID) tarafından başlatılır. AICDA, sitozinin (c) urasile (u) deaminasyonunu indükler. Replikasyon sistemi, üridini timidine dönüştürür ve böylece act > t geçişine (ve g > karşı iplikçik üzerinde bir geçişe) yol açar. SHM'de urasil, urasil DNA glikosilaz (UNG) tarafından uzaklaştırılır ve bu abazik bölge, DNA baz eksizyon tamiri (BER) yolu veya DNA uyumsuzluk tamiri (MMR) sistemleri tarafından daha da işlenir. DNA lezyonları, hataya açık DNA polimerazlar tarafından onarılır ve bu da nükleotid geçişlerine ve transversiyonlara yol açar (56).

IgVH gen mutasyon durumu şu anda KLL hastalarında klinik sonucun en güvenilir göstergelerinden biri olarak geniş çapta kabul edilmektedir. Prognozu belirlemek için kullanılan diğer belirteçlerin aksine IgVH mutasyon durumu hastalık boyunca stabildir (57). IgVH genlerinin mutasyon durumu ile KLL hastalığının prognozu arasında güçlü bir ilişki olduğu bildirilmiştir (8). CD38, CD49d ve ZAP70 ekspresyonu, IgVH mutasyon durumuyla ilişkilendirilmiştir ve iki KLL alt kümesini ayırt etmede yedek belirteçler olarak kullanılırlar (58).

IgVH gen mutasyonuna sahip KLL (M-KLL), periferik lenfoid dokunun germinal merkezinde somatik hipermutasyona maruz kalan BCR'lere sahip bellek B hücrelerinden kaynaklanır (Şekil 2.5). M-KLL'deki BCR'ler, germline IgVH dizisi ile %98'den daha az

homolojiye sahiptir (25). KLL hastalarının yaklaşık yarısında (hastaların 50-70'i) IgVH somatik mutasyonu tespit edilmiştir ve bu hastalarda UM-KLL'den daha iyi prognoza sahip, hastalık seyrinin daha yavaş ve sağ kalımında daha uzun olduğu görülmüştür (5). M-KLL, 13q delesyonları ve trizomi 12 gibi sitogenetik belirteçler ile ilişkilendirilmiştir. M-KLL hastalarında ayrıca daha uzun ilerlemesiz sağkalım (PFS) yaşanır ve OS, yirmi yıldan fazladır (59).

IgVH gen mutasyonuna sahip olmayan KLL (UM-KLL), CD5'i eksprese eden olgun, saf B hücrelerinden kaynaklanır (Şekil 2.5). KLL hücresinin yüzeyindeki B hücresi reseptörü (BCR), germ hattı IgVH sekansı ile %98'den fazla homolojiye sahiptir ve KLL'li hasta popülasyonunun yaklaşık %30-50'sinde IgVH somatik mutasyonu tespit edilmemiştir (25,57). UM-KLL, yüksek CD38, CD49d ve ZAP-70 ekspresyonunun yanı sıra 11q ve 17p delesyonu gibi olumsuz riskli sitogenetik belirteçler ile ilişkilidir. Mutasyona uğramamış IgVH'li hastalar daha agresif hastalığa ve daha kısa PFS'ye sahip olma eğilimindedir; OS, yaklaşık sekiz yıldır (57,60).




**Şekil 2. 5:** B hücresi gelişimi ve BCR olgunlaşması

B hücreleri kemik iliğinde bir dizi olgunlaşma aşamasından geçer ve bu aşamalar, yüzeylerinde IgM ve IgD izotip reseptörlerini eksprese eden olgun B hücrelerinin oluşmasına yol açar. B hücreleri daha sonra lenf bezleri ve dalak dahil olmak üzere ikincil lenfoid organlarda olgunlaşmaya devam eder; burada antijenle karşılaştıktan sonra BCR'ler somatik hipermutayon (SHM) ve sınıf değiştirme rekombinasyonu (CSR) yoluyla daha da çeşitlenir. KLL, UM-KLL'nin mutasyona uğramamış immünoglobulinleri eksprese eden saf B hücrelerinden türetildiği, M-KLL'nin ise SHM'ye maruz kalmış bellek B hücrelerinden türetildiği farklı öncülerden kaynaklanır. Daha küçük, IgG eksprese eden bir alt grup, CSR'ye tabi tutulmuş bellek B hücrelerinden ortaya çıkabilir.

**2.3.5.2. ZAP70:** ZAP70, NK ve T hücreleri tarafından eksprese edilen ζ-zinciri ilişkili protein kinaz 70 kDa'yı kodlar (61). ZAP70, T lenfositlerinde önemli bir role sahiptir ve hücre göçünde, apoptozda, T hücre reseptör sinyalizasyonu ve aktivasyonunda rol oynar (62). Ayrıca hem malign hem de normal B hücreleri, çeşitli farklılaşma aşamalarında ZAP70'i eksprese eder. ZAP70 aynı zamanda BCR sinyallemesinde de rol oynar ve yapısal olarak homolog SYK proteinine benzer bir mekanizma ile antijen bağlanması üzerine BCR sinyal kompleksine alınır (63).

KLL'de yüksek ZAP70 ekspresyon varlığı ilk olarak IgVH mutasyonlu ve IgVH mutasyonsuz olguları karşılaştıran bir çalışmada tanımlanmıştır. Bu çalışmada, mutasyona uğramamış IgVH genlerine sahip hastalarda ZAP70'in aşırı ekspresyonu tespit edildi ve ZAP70, IgVH mutasyon durumu için bir biyobelirteç olarak önerildi (64). Yapılan diğer çalışmalar bu bulguyu doğrulamış ve ZAP70'in KLL'de hastalığın ilerlemesi ve OS açısından olumsuz bir hastalık seyri öngördüğünü bildirmiştir (65,66). ZAP70'in flow sitometri ile tespiti dışında, mRNA ekspresyonu da hastalığın prognozuyla ilişkilendirilmiştir ve bu bulgu, flow sitometri ölçümleriyle karşılaştırıldığında daha güvenilir olabilecek kantitatif mRNA ölçümü olasılığının önünü açmıştır (67).

**2.3.5.3. CD38:** Transmembran glikoprotein CD38, hematopoetik kökenli hücreler tarafından eksprese edilir; aktif B ve T hücrelerinin yanı sıra NK ve dentritik hücrelerde de yüksek ekspresyona sahip, siklaz ve hidrolaz aktivitesi bulunan bir ektoenzimdir (68). CD31 (PECAM-1) ile etkileşime girerek hücre yüzey reseptörü olarak sinyal iletiminde veya hücre içi kalsiyum regülasyonunda rol oynar (69).

CD38 ekspresyonu için cut-off değeri, yapılan çalışmalar arasında önemli ölçüde değişiklik göstermektedir (%5'ten %30'a kadar) (67). Yüksek CD38 ekspresyonu (>%30), KLL hastalarında progresif hastalık ve dolayısıyla kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. IgVH mutasyonu saptanmayan durumlarda yüksek CD38 ekspresyonu ile bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (8).

**2.3.5.4. Serum belirteçleri:** KLL'de yaygın olarak kullanılan serum belirteçleri β2 mikroglobulin (β2-M) ve laktat dehidrogenaz (LDH)'dır (67). β2-M, membran bağımlı bir protein olup çekirdekli hücrelerde bulunur. LDH, hücre döngüsünü gösteren bir belirteçtir. KLL hastalarında, serum β2-M ve LDH seviyeleri hastanın klinik evresini yansıtır ve tümör yüküyle ilişkilendirilir. β2-M ve LDH seviyelerinin yüksek olması kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (70). Yüksek β2-M düzeyi gösteren Binet evre A hastalarında, düşük β2-M düzeyleri olan evre A hastalarına kıyasla progresyonsuz sağkalım (PFS) daha kısadır, bu durum β2-M'nin sessiz hastalığı olan hastalarda ek prognostik bilgi sağladığını gösterir (71).

**2.3.5.5. Kromozomal anomaliler:** KLL, heterojen genetik profile sahip bir hastalıktır. KLL hastalarında konvansiyonel sitogenetik analiz ile anomali saptama oranı %40-50 iken, interfaz flouresan in-situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile bu oran %80-85'e çıkarılmıştır. Dengeli translokasyonların sık görüldüğü diğer B hücreli lösemilerin

aksine, KLL'de en sık gözlenen kromozomal anomaliler; mutasyonlar, delesyonlar ve trizomilerdir (72).

FISH yönteminde KLL'deki en yaygın anomalileri tespit etmek için spesifik genlere veya gen bölgelerine özgü prob paneli kullanılır. Bunlar; 6q23 (MYB) delesyonları, kromozom 12 için sentromerik bir prob kullanılarak tanımlanan trizomi 12, 11q22.3 (ATM) delesyonları, 13q14 delesyonu veya nullizomi ve monozomi veya nullizomi 13, 14q32 anomalileri (IGH gen lokusu) ve 17p13.1 (TP53) delesyonunu kapsar. Bu anomalilerin her birinin sıklığı, tüm etnik gruplar arasında benzer yüzdelerde gözlenmektedir, ancak KLL'nin ortaya çıkışında coğrafi farklılıklar bulunmaktadır (73).

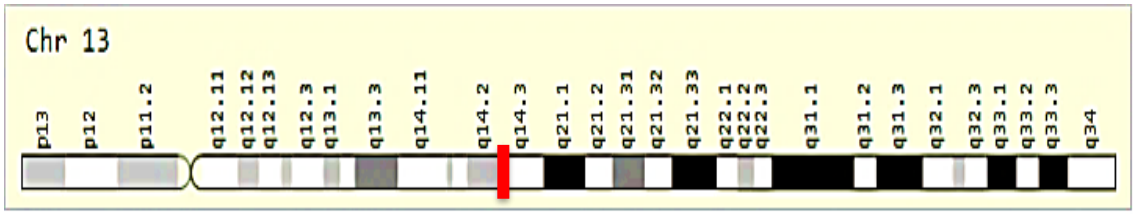
2.3.5.5.1. Kromozom 13q delesyonları: Özellikle 13q14 (del[13q14]) bandını içeren delesyonlar, tüm vakaların yaklaşık %50-60'ında meydana gelen, KLL'de en sık görülen sitogenetik anomalilerdir (74). 13q14 delesyonu, 13q14'ün her iki kopyasının delesyonuyla sonuçlanarak bialelik olabilir; bu aynı zamanda nullizomi 13q14 olarak da bilinir (75). 13q14'ün monoalelik delesyonları, 13q14'ün bialelik delesyonlarından daha sık meydana gelir (76).

Kromozom 13q bölgesinde bir minimal delesyon bölgesi (MDR) tanımlanmıştır. Bu bölge DLEU1 (deleted in leukemia-1) geninin 1.ekzonunu, DLEU2 (deleted in leukemia-2) genini ve DLEU2 geninin intronik bölgesinde lokalize olan mikroRNA (miRNA)-15a/16-1'i içermektedir (Şekil 2.6) (77,78). Bu miRNA'ların patofizyolojik rolü, kodlayıcı olmayan RNA geni DLEU2'nin delesyonu ile birlikte miRNA-15a/16-1 lokusunun hedeflenen delesyonunu taşıyan genetik olarak tasarlanmış fareler ile yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda miRNA-15a/16-1 kümesinin tümör baskılayıcı genler olarak görev yaptığı gösterilmiştir (78,79). miRNA-15a/16-1'in, siklinler (CCND1, CCND3), siklin-bağımlı kinazlar ve apoptoz ilişkili genlerin (BCL2 gibi) ekspresyonlarını değiştirdiği gösterilmiştir. Bu miRNA'ların ekspresyonunun anti apoptotik bir gen olan BCL2'nin ekspresyonu ile ters ilişkili olduğu ve her iki miRNA'nın post-transkripsiyonel aşamada BCL2'yi negatif bir şekilde düzenlediği gösterilmiştir (80). KLL hastalarında bu miRNA'ların ekspresyonunun azalması, $CD5^+$ hücrelerinde BCL2 gen ekspresyonunda bir artışa ve dolayısıyla apoptozda bir azalmaya yol açar. KLL'de B lenfositlerinin sağkalım oranının artması, apoptoz sürecinin inhibisyonuna ve dolayısıyla hastalığı karakterize eden uzun ömürlü, klonal lenfositlerin birikmesine yol

açan BCL2 ailesi proteinlerinin anormal ekspresyonu sonucu olduğu düşünülmektedir (81).

miR-15a ve miR-16-1'ın ayrıca pro-apoptotik bir gen olan p53 ekspresyonunu da indükleyebileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, 13q delesyonu olan hastalarda miR-15a ve miR-16-1 kaybı, bir yandan BCL2 aracılığıyla apoptozu azaltırken, diğer yandan p53 aracılığıyla tümör büyümesini de azaltır. Anti-apoptotik ve proapoptotik moleküller arasındaki dengesizlik, KLL'de apoptoza direnç mekanizmalarından biri gibi düşünülmektedir ve bu nedenle B lenfositlerinin ömrünü belirleyen anahtar bir faktördür. Bu sonuçlar, KLL hastalarında 13q delesyonunun iyi prognoz ile ilişkili olduğunu açıklamaktadır. Ayrıca 13q delesyonu olan hastalarda p53 seviyelerindeki artış, ZAP-70 seviyelerinin azalmasına yol açarak pozitif sağkalım korelasyonu göstermektedir (81,82).

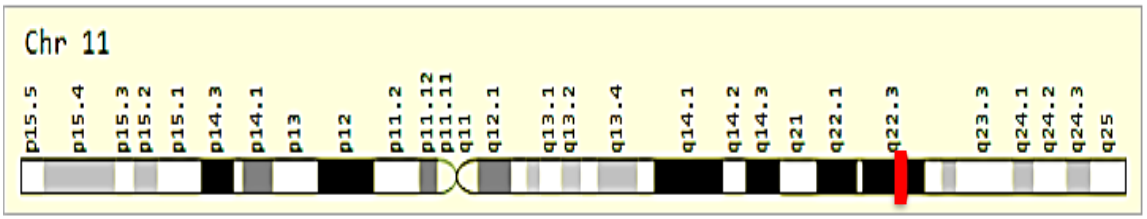
Sadece 13q14 delesyonu olan vakalar, yaklaşık 133 ay ile en uzun ortalama tedavi gerektirmeyen aralığa ve hayatta kalma süresine sahiptir. 13q delesyonları çoğunlukla mutasyona uğramış IgVH genleri (M-KLL) ile ilişkilidir; bu aynı zamanda olumlu bir prognostik belirteç olarak kabul edilir, ancak mutasyona uğramamış IgVH genleri (UM-KLL) olan vakalarda da 13q delesyonları not edilmiştir (83).




**Şekil 2. 6:** 13. kromozomda miRNA-15a/16-1 lokasyonu (77)

2.3.5.5.2. Kromozom 11q delesyonları: Kromozom 11'in uzun kolundaki (del[11q]) delesyonlar, KLL hastalarının %5-20'sinde, kemoterapi almamış ileri evre hastaların yaklaşık %25'inde ve erken evre hastaların %10'unda görülmektedir (84). Bu delesyonlar sıklıkla, herediter bir sendrom olan Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) genini barındıran 11q22.3-q23.1 kromozom bandında lokalizedir (Şekil 2.7) (85). ATM geni, p53 aktivasyonu yoluyla hücre siklusunun kontrolünde, DNA tamir mekanizmalarında, oksidatif strese karşı direnç mekanizmalarında, telomer bölgelerinin korunmasında ve apoptoziste önemli rol oynayan bir tümör baskılayıcı gendir (86).

11q delesyonu, KLL hastalarında kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir ve bu delesyona sahip hastalar büyük ve çoklu lenfadenopati, hızlı progresyon, daha kısa remisyon süreleri ve daha kısa genel sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (74).

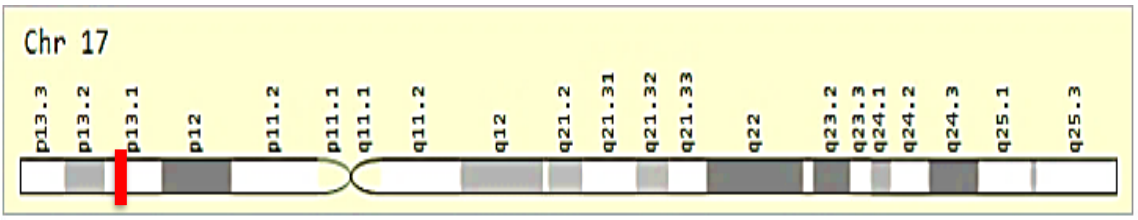



**Şekil 2. 7:** 11. kromozomda ATM gen lokasyonu (85)

2.3.5.5.3. Kromozom 17p delesyonları: Kromozom 17'nin kısa kolundaki delesyonlar (del[17p]), birinci basamak tedavi endikasyonunda KLL hastalarının %5-8'inde bulunur. Bu delesyonlar, genellikle TP53 (tümör protein 53)' ün lokalize olduğu 17p13 bandını içerir (Şekil 2.8) (87,88). 17p delesyonu, TP53'ün inaktivasyonuyla ilişkilidir, dolayısıyla genomik kararsızlığa neden olur. TP53 geni, kromozom 17p13.1'da yer alır ve apoptozun indüklenmesi ile DNA hasarına hücresel cevabın düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. TP53 mutasyonları KLL hastalarının %4-37'sinde bulunur ve çok kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (89).

Doğrulanmış del(17p) vakalarının büyük bir kısmında, her iki TP53 alelinde de mutasyon vardır (90). del(17p)'nin olmadığı durumlarda, TP53 mutasyonları çok daha nadirdir ancak kemoterapi yanıtı ve genel sağkalım üzerinde benzer şekilde zararlı bir etkiye sahiptir. Bu delesyon aynı zamanda DNA'ya zarar veren ajanlara (radyoterapi veya kemoterapi) karşı dirençle de bağlantılıdır ve tanı anında varlığı genellikle olumsuz ortalama sağkalım (OS)'ye işaret eder. Yeni tanı KLL hastalarında TP53 aberasyonları hastalığın hızlı progresyonu ve tanı anından itibaren ortalama 3-4 yıl sağkalım ile ilişkilendirilmektedir (89,91).

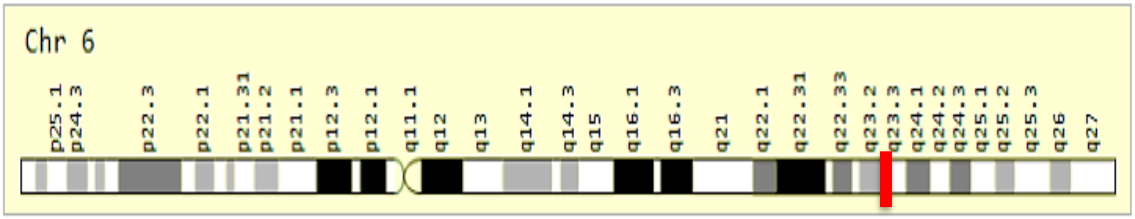
17p delesyonu veya TP53 gen mutasyonu olan hastalar pürin analoglarına dirençlidir. Fludarabin, siklofosfamid ve/veya rituksimab ile standart tedavi bu nedenle bu grup hasta için pek yararlı değildir. Ancak bunun tersine, alemtuzumab bu hastalarda özellikle metilprednizolon ile kombinasyon halinde çok etkilidir (86).




**Şekil 2. 8:** 17. kromozomda TP53 gen lokasyonu (87)

2.3.5.5.4. Trizomi 12: Kromozom 12 trizomisi, KLL hastalarının %15-20'sinde görülür ve orta prognostik belirteç olarak değerlendirilir. Trizomi 12, lösemik hücrelerde lenfositlerin atipik morfolojisi ve immünofenotipi ile ilişkilendirilmiştir (92). Trizomi 12'li olgularda daha yüksek düzeyde CD20 eksprese edilir ve nadiren TP53 mutasyonları görülür (88). Bu hastalarda tedaviye başlama süresinin ortalama 33 ay, genel sağkalım süresinin ise ortalama 114 ay olduğu belirtilmektedir (76).

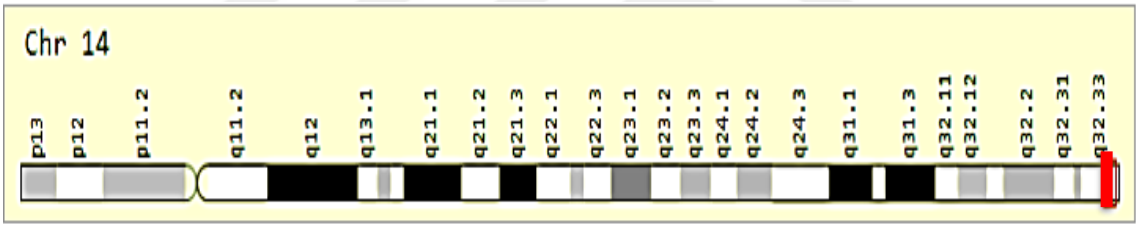
2.3.5.5.5. Kromozom 6q delesyonları: 6q delesyonları, KLL'de olguların %3-10'unda, çoğunlukla ikincil bir kromozom anomalisi veya karmaşık karyotipler olarak ortaya çıkmaktadır (93). KLL'de bu delesyonlar sıklıkla, 6q23 (MYB) kromozom bandında lokalizedir (Şekil 2.9) (94). 6q delesyonu ile yüksek beyaz kan hücresi (WBC) sayımı, tanı anında daha yaygın adenopati ve daha kısa tedavi gerektirmeyen aralık (TFI) arasında bir ilişki bulunmuştur. 6q delesyonlu KLL, yüksek oranda atipik morfoloji, CD38 pozitifliği olan klasik immünfenotip ve mutasyona uğramamış IgVH ile karakterize edilmiştir (95). 6q delesyonu olan olguların, orta düzeyde prognoza sahip olduğu rapor edilmiştir (96).




**Şekil 2. 9:** 6. kromozomda MYB gen lokasyonu (94)

2.3.5.5.6. Kromozom 14q anomalileri: Kromozom 14 üzerinde bant q32'de bulunan immünoglobulin ağır zincir lokusu (IGH) gen bölgesini (Şekil 2.10) (97) içeren delesyonlar ve yeniden düzenlemeler gibi kromozomal anomaliler, KLL dahil olmak üzere olgun B hücresi malignitelerinde rapor edilmiştir. IGH bölgesi, kromozom 14 üzerinde birçok genden oluşan geniş bir bölgedir ve IGH anomalileri tipik olarak değişken bölgeyi içerir. 14q32 delesyonlarının literatürde rapor edilen sıklığı %2-24'tür (98).

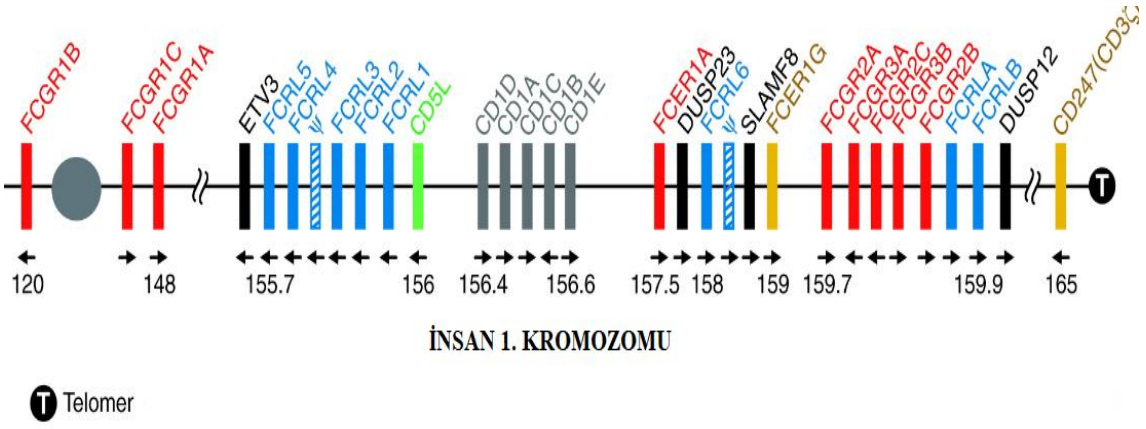
14q32 bölgesini içeren translokasyonlar birçok B hücresi malignitelerinde gözlenir ancak KLL'de nadirdir ve KLL vakalarının yaklaşık %4-9'unda görülür (99). IGH translokasyonlarının prognostik etkileri diğer malignitelerde açıklanmıştır, ancak bu translokasyonların KLL'deki etkileri büyük ölçüde bilinmemektedir (100). IGH ile ilişkili en yaygın kromozomal aberasyonlar, 2p (BCL11A), 6p (CCND3), 8q (MYC), 11q (CCDN1), 18q (BCL2) ve 19q (BCL3) ile translokasyonlarını içerir (99,101).




**Şekil 2. 10:** 14. kromozomda IGH gen lokasyonu (97)

## 2.4. FC RESEPTÖR BENZERI PROTEİN (FCRL)

Fc reseptör benzeri protein ailesi olarak adlandırılan FCRL, B hücreleri tarafından eksprese edilen tirozin bazlı sinyal özelliklere sahip Tip-1 transmembran proteinlerini kodlar. FCRL molekülleri, potansiyel aktive ve inhibe edici rollere sahip immünglobulin süper ailesine (IgSF) aittir. FCRL ailesi üyeleri, kromozom 1q21–23'ün ~4 Mb bölgesi üzerinde üç farklı lokusta bulunur. İnsanlarda bu aile, altı transmembran reseptörü (FCRL1-6) ve transmembran bölgesi içermeyen FCRLA ve FCRLB dahil olmak üzere iki sitoplazmik proteini kodlar. FCRL 1-5 genleri, yüksek afiniteli FcyRI geninin (FCGR1A) telomerik lokusunda 1q21-22 kromozomunun ~300 kb'lik bir bölgesini kapsar. FCRL6 geni, yüksek afiniteli IgE geninin (FCER1A) daha ileri telomerik ve proksimalinde bulunan ayrı bir lokusta bulunur (Şekil 2.11) (10).

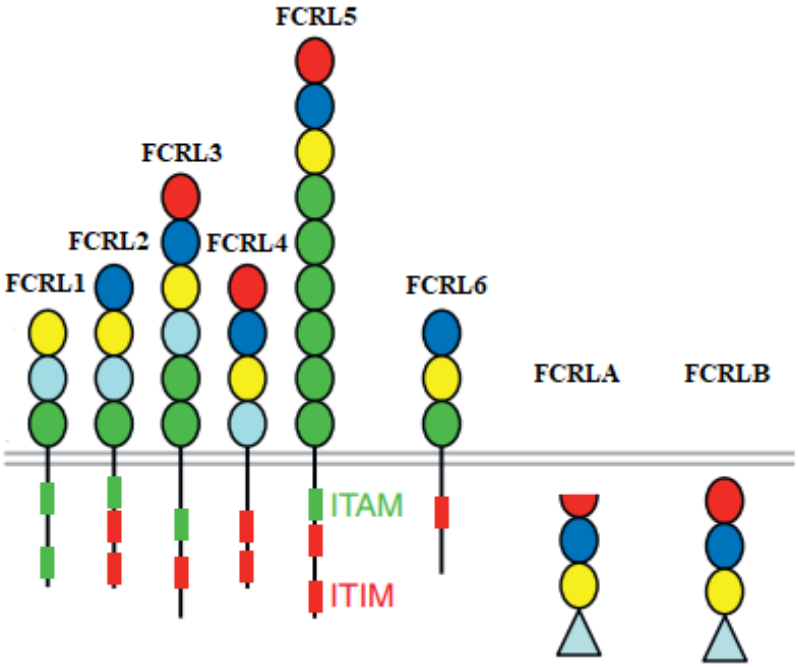



**Şekil 2. 11:** İnsan 1. kromozomunda FCRL genlerinin lokasyonu (Davis, RS. ve ark. 2007'den değiştirilerek alınmıştır) (10)

FCRL ailesi üyeleri, tirozin bazlı immün düzenleyici potansiyele sahiptir. FCRL ailesi üyelerinin B-hücresi sinyalini pozitif ve/veya negatif bir şekilde etkilediği ve dolayısıyla doğuştan gelen ve adaptif hümoral bağışıklığı düzenleme işlevi gösterebileceği düşünülmektedir (11,12). Sitoplazmik bölgelerinde immünoreseptör tirozin bazlı aktive edici/inhibitör motiflerin (ITAM/ITIM) varlığı nedeniyle, bu moleküllere bazı immünomodülatör roller atfedilmiştir (Şekil 2.12) (10). Aktive edici ve/veya inhibe edici sinyaller iletme potansiyelleri, bu reseptörlerin hücresel farklılaşmayı düzenlemede ve B hücresi yanıtlarının başlatılmasını ve sonlandırılmasını modüle etmede bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (102,103). Son zamanlarda birkaç FCRL için ligandlar tanımlanmıştır. İnsanlarda FCRL4 ve FCRL5 sırasıyla IgA ve IgG'yi bağlar, FCRL6 ise majör doku uyumluluk kompleksi sınıf II (MHCII) proteini HLA-DR ile etkileşime girer. Bu reseptörlerin evrimsel süreçte korunmaları, bağışıklıkta, otoimmünitede, maligniteler ve immün yetmezlikler dahil olmak üzere birçok immün hastalıkta temel bir rol oynadığını göstermektedir (104).

FCRL gen ailesi, bağışıklık hücrelerinin yüzeyinde reseptör görevi gören proteinleri kodlayarak bağışıklık sisteminde rol oynayan bir gen ailesidir. Bu reseptörlerin, bağışıklık tepkisinde yer alan antikorlar ve diğer moleküller ile etkileşime girdiği bilinmektedir. Son araştırmalar, FCRL genlerinin çeşitli tümör türlerinin gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynayabileceğini öne sürmüştür. Birçok çalışma FCRL1-5 ile B hücreli maligniteler arasında potansiyel bir ilişki tespit etmiştir. FCRL1-5'in

immünomodülatör etkileri, bunların ilgili hastalarda hedefe yönelik teşhis, tedavi ve prognoz için aday olma potansiyelini vurgulamaktadır (105).




**Şekil 2. 12:** FCRL genlerinin yapısı (Davis, RS. ve ark. 2007'den değiştirilerek alınmıştır) (10)

FCRL1-5 yalnızca B soy hücreleri tarafından eksprese edilir ve B hücresi antijen reseptörü (BCR) aracılı sinyallemeyi modüle eder (106). FCRL1 ekspresyonu, kemik iliğinde, pre-B hücrelerinde başlar ve farklılaşmanın bir fonksiyonu olarak artar ve olgun B hücreleri arasında en yüksek seviyelere ulaşır (107). FCRL1, insanlarda BCR aktivasyonunu teşvik eden iki potansiyel ITAM benzeri motife sahip olduğu için B hücreleri üzerinde aktive edici eş reseptör görevi görebileceği gösterilmiştir (108). FCRL2'nin, kemik iliğinde pre-B hücrelerinde tarafında eksprese edilmediği hafıza B hücreleri tarafından eksprese edildiği gösterilmiştir. FCRL5, kemik iliğindeki pre-B hücrelerde tanımlanabilir, ancak diğer aile üyelerine benzer şekilde, çevrede maksimum düzeyde ekspresyon elde eder (107). FCRL2, dört hücre dışı Ig benzeri alana ve hafıza B hücreleri tarafından ifade edilen ITIM ve ITAM benzeri sekanslara sahip sitoplazmik kuyruğu olan bir transmembran proteinini kodlar. FCRL2 ve FCRL5'in insanlarda olgun

B hücreleri üzerinde inhibitör eş reseptör olarak hizmet etme fonksiyonel potansiyeli sergilediği ve B hücrelerinde antijen reseptör aktivasyonunu baskılayabildiği tespit edilmiştir (109). FCRL3 ekspresyonu da kemik iliği B hücrelerinde belirgin bir şekilde tespit edilmez. FCRL3, T ve NK hücrelerinin alt gruplarında B soyunun dışında eksprese edilir. FCRL4 tercihen subepitelyal bölgelere lokalize olan, doku bazlı hafıza B hücrelerinin alt kümesinde eksprese edilmektedir. FCRL4'ün kemik iliğinde veya kan lökositlerinde kayda değer seviyelerde eksprese edildiği görülmemektedir (107). FCRL4'ün, sitoplazmik bölgesinde ITIM varlığı nedeniyle B hücre reseptöründen aktive edici sinyalleri güçlü bir şekilde ortadan kaldırabileceği bildirilmiştir (110). İnsan FCRL3 ve FCRL4'te bileşik aktive edici ve inhibe edici sinyalleme kapasitesi mevcuttur. Bu proteinler, B hücresi uyarımının doğuştan (Toll benzeri reseptör/TLR) veya adaptif (BCR) doğasına göre farklılık gösteren ikili düzenleyici özelliklere sahiptir (111,112).

# 3. GEREÇ VE YÖNTEM

## 3.1. GEREÇLER

### 3.1.1. Gönüllülerden Kan Örneklerinin Alınması

Çalışmamıza İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları A.B.D., Hematoloji BD.' a Kasım 2021-Kasım 2023 tarihleri arasında başvuran ve tedavi almayan 18 yaş üstü 60 KLL hastası dahil edildi. Çalışmaya başlamadan önce, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı (Karar no: 2021/17-2) (EK-1). Çalışmaya girmeyi kabul edenler gönüllü olur formunu (EK-2) doldurup imzaladıktan sonra İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji BD.' da, flow sitometrik analiz, FISH yöntemiyle kromozomal anomalilerin (del13q14, del11q22, trizomi 12, del17p13, del14q32 ve del6q23) belirlenmesi ve biyokimyasal parametrelerin analizi gerçekleştirildi (EK-3). Gönüllülerden rutin izlem sırasında EDTA'lı tüpe 2 ml periferik kan örneği alındı ve soğuk zincirle Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na nakledildi. Gelen kanlardan aynı gün içerisinde RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrik yöntemle ölçüldükten sonra RNA örnekleri -80 derece derin dondurucuya kaldırıldı.

### 3.1.2. Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları Tablo 3.1'de verilmiştir.

**Tablo 3. 1:** Kimyasallar

| Kimyasal Adı | Kullanım Amacı |
|---|---|
| Etil alkol (%99, Merck) | RNA presipitasyonu ve FISH analizi |
| Kloroform (Sigma, USA) | RNA pürifikasyonu |
| İzopropanol (Sigma, USA) | RNA presipitasyonu |

**Tablo 3.1** (devam)

| | |
|---|---|
| Phosphate Buffer Saline (PBS) (Sigma, USA) | Flow sitometri |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, USA) | FISH analizi |
| Metanol (Merck, Germany) | FISH analizi |
| Asetik Asit (%100 glacial, Merck, Germany) | FISH analizi |
| Potasyum Klorid (KCI) (Merck, Germany) | FISH analizi |
| Salin Sodyum Sitrat (SSC) Buffer 20X (AppliChem, Germany) | FISH analizi |
| Tween 20 (Sigma, USA) | FISH analizi |

### 3.1.3. Kitler

Tez çalışmasında kullanılan kitlerin adı ve kullanım amaçları Tablo 3.2'de verilmiştir.

**Tablo 3. 2:** Kitler

| Kitin Adı | Kullanım Amacı |
|---|---|
| QIAzol Lysis Reagent (Cat no: 79306) (Qiagen, Germany) | RNA izolasyonu |
| RT² First Strand Kit (Cat no: 330404) (Qiagen, Germany) | cDNA sentezi |
| RT² SYBR Green FAST Mastermix (Cat no: 330600) (Qiagen, Germany) | PCR array |
| 13q14.3 Deletion Probe (Cat no: LPH006) (Cytocell, UK) | FISH analizi |
| P53 (TP53) / ATM Probe Combination (Cat no: LPH052) (Cytocell, UK) | FISH analizi |
| Alpha Satellite 12 Plus for CLL (Cat no: LPH069) (Cytocell, UK) | FISH analizi |
| MYB Deletion Probe (Cat no: LPH016) (Cytocell, UK) | FISH analizi |
| IGH Plus Breakapart Probe (Cat no: LPH070) (Cytocell, UK) | FISH analizi |
| High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat no: 11796828001) (Roche, Switzerland) | DNA izolasyonu |

### 3.1.4. Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazların adı, markası ve kullanım amaçları Tablo 3.3'te verilmiştir.

**Tablo 3. 3:** Cihazlar

| Cihazın Adı | Kullanım Amacı |
|---|---|
| PCR Cihazı (Thermal Cycler) (Blue-Ray/ tcst-9620) | PCR işlemi |
| Real-time PCR (Roche, LightCycler 480II) | Gen ekspresyonu işlemi |
| Elektroforez (Hoefer) | Elektroforez işlemi |
| Jel Görüntüleme Sistemi (CCD kameralı) (Syngene/G: BoxF3) | Agaroz jel sonrası sonuçların görüntülenmesi |
| UV Transluminatör (Yatay) (DAIHANWisd/ WUV-L20) | Moleküler genetik çalışmalar |
| Mikrodalga fırın (BEKO/MD2610) | Elektroforez işlemi |
| Otomatik pipet seti (Eppendorf) | Moleküler genetik çalışmalar |
| Spektrofotometre ve Florometre (DENOVIX/DS-11FX) | DNA/RNA/protein konsantrasyon ölçümü |
| Benmari (Nüve, bathnb9) | FISH analizi |
| Hibridizasyon Fırını (Dako, Hybridizer, StatSpin) | FISH analizi |
| Floresan Mikroskop (ZEISS, Axioskop 2 Plus) | FISH analizi |
| Navios Flow Cytometer (Beckman Coulter) | Flow sitometri analizi |
| NovaSeq 6000 Sequencing System (Illumina) | WES analizi |
| Derin Dondurucu (-80 $^{o}$C) (DAIHAN/Duo Freez U500) | Örneklerin muhafazası |
| Derin Dondurucu (-20 $^{o}$C) (BOSCH/GSN36AI31) | Örneklerin muhafazası |
| +4 buzdolabı (Arçelik) | Genel kullanım |
| Masaüstü soğutmalı ultrasantrifüj (Gyrozen) | Moleküler genetik çalışmalar |
| Hassas Terazi, 0.1 mg hassasiyeti (SHIMADZU/ATX224, SEG) | Solusyon hazırlanması |
| Güç Kaynağı (Hoefer/PS300B) | Elektroforez işlemi |
| Isıtıcı Blok (Stuart/SBH130D) | Moleküler genetik çalışmalarda |
| Vorteks 4S (DAIHAN- Wisd/ VM-10) | Genel kullanım |

**Tablo 3.3** (devam)

| | |
|---|---|
| İnkübator (DAIHAN/ IG-50) | İmmünhistokimyasal ve inkübasyon gerektiren tüm çalışmalar |
| Distile su cihazı (Elga) | Genel kullanım |
| Kar buz makinesi (IMS-50) | Genel kullanım |
| Otoklav (ALP) | Malzeme sterilizasyon |

## 3.2. YÖNTEMLER

### 3.2.1. Flow Sitometrik Analiz

Örnekler, üretici firmanın protokolüne göre Intraprep fiksasyon ve permeabilizasyon yöntemi (Beckman Coulter, Miami, FL) kullanılarak hazırlandı. Fiksasyon ve permeabilizasyonun ardından, 100 uL tamponda (fosfat buffer salin %50 normal fare serumu) 1 x $10^6$ hücre, CD45 monoklonal antikoru ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Veri toplama, 10 renkli Navios flow cytometer (Beckman Coulter) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Veri analizi, EXPO32 (Beckman Coulter) veya WINLIST (Verity Software House, Topsham, ME) yazılımı kullanılarak yapıldı. Kullanılan tüm analiz yöntemleri için, germline vakaların ve mutasyona uğramış vakaların fraksiyonu, her bir yöntemde boyamayı tanımlayan potansiyel eşik aralığı için hesaplandı. Her iki uç nokta için en iyi kombinasyonu sağlayan cut-off belirlendi.

### 3.2.2. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Analizi

- Her hasta için ilk olarak 15 ml'lik falcon tüpe 6 ml kadar DMEM besiyeri koyuldu. Her hastanın periferik kan örneğinden 4 ml eklendi. Falcon tüp karıştırıldı ve 3000 rpm'de 6 dk santrifüj edildi. Süpernatant döküldü. Pelet üzerine 10 ml KCL çözeltisi eklendi ve karıştırıldı. 15 dk boyunca 37 $^0$C'de bekletildi. 3000 rpm'de 6 dk santrifüj edildi. 3 birim metanol ve 1 birim asetik asit karışımı yavaş yavaş falcon tüpe eklendi ve karıştırıldı. 3000 rpm'de 6 dk santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve aynı aşama tekrar edildi. Çalışma yapılana kadar +4 $^0$C'de muhafaza edildi.

- Hücre bir lam üzerine yayıldı ve kuruması beklendi. Lam 2 dakika boyunca oda sıcaklığında 2X Salin Sodyum Sitrat (SSS) içine batırıldı. Sonrasında, oda sıcaklığında 2 dakika boyunca sırasıyla %70, %85 ve %100 etanol içerisinde dehidrasyon yapıldı ve lamın kuruması beklendi.
- Probdan 10µl alındı ve lamdaki hücre numunesi üzerine damlatıldı ve üzerine bir lamel kapatıldı. Kauçuk çözelti yapıştırıcısıyla lamelin kenarları sabitlendi ve yapıştırıcının tamamen kuruması beklendi. Lam, hibridizasyon fırını içerisinde 75ºC'de (+/- 1ºC) 2 dakika sonrasında 37ºC'de (+/- 1ºC) bir gece bekletildi.
- Hibridizasyon sonrası lamel çıkarıldı ve 72ºC'de (+/- 1ºC) benmaride 0,4'lük Salin Sodyum Sitrat (SSS) içerisinde 2 dakika ısıtılarak numunenin ve probun eş zamanlı olarak denatüre edilmesi beklendi. Sonrasında lamel 2XSSS+%0,05 Tween 20 karışımına batırılarak yıkandı. Lam 15 dakika boyunca karanlıkta kurutuldu.
- Her numuneye 10µl DAPI antifade uygulandı ve lamel ile kapatıldı. 15 dakika boyunca karanlıkta bekletilerek rengin belirginleşmesi sağlandı. Sonrasında floresan mikroskopta (ZEISS Axioskop2 Plus) 100X objektif ile immersiyon yağı kullanılarak görüntülendi.
- Sonuçlar, Isis FISH Imaging System (MetaSystems) kullanılarak analiz edildi.

### 3.2.3. Tüm Ekzon Dizileme (WES) Analizi

Flow sitometri ve FISH analizi sonrasında immünofenotipik belirteçler kullanılarak belirlenen 10 hasta örneği için WES analizi yapıldı. Bu hastalarda IgVH somatik hipermutasyon durumu ile hastalıkla ilişkili olabilecek patojenik ve olası patojenik varyantlar tespit edildi.

Hastalardan alınan EDTA'lı tüplerdeki periferik kanın 200 µl'si kit protokolüne uygun bir şekilde (Roche High Pure PCR Template Preparation Kit) genomik DNA izolasyonu için kullanıldı. Bu yöntemde DNA'yı ayırmak için özel filtreler kullanıldı. Bu kit ile yaklaşık olarak 50 µl elution bufferda sulandırılmış genomik DNA elde edildi.

Roche High Pure PCR Template Preparation Kit ile DNA izolasyonu aşamaları aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

- Hibridizasyon fırını +70°C'ye ayarlandı.
- Elution buffer ısıtıcı blok içine koyuldu.
- 1,5 ml'lik ephendorf tüp içine 200 µl Kan, 200 µl Buffer ve 40 µl Proteinaz K eklenerek karışım hazırlandı.
- Karışım vortekslendikten sonra, 10 dk +70°C'de bekletildi.
- Karışımın üzerine 100 µl izopropanol eklendi ve iyice alt üst edildi.
- Karışım altında toplama tüpü bulunan filtreli spin kolona aktarıldı ve 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
- Alt kısımdaki toplama tüpü atıldı ve filtreli spin kolon yeni toplama tüpü koyuldu.
- Üzerine 500 µl "Removel Buffer" eklendi ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Alt kısımdaki toplama tüpü atıldı ve yeni toplama tüpü koyuldu.
- Üzerine 500 µl "Washing Buffer" eklendi ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Alt kısımdaki toplama tüpü atıldı ve yeni toplama tüpü koyuldu.
- Üzerine 500 µl "Washing Buffer" eklendi ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Alt kısımdaki toplama tüpü atıldı ve yeni toplama tüpü koyuldu.
- Kalan buffer'ın uzaklaştırılması için 14000 rpm'de 15 sn spin edildi.
- Alt kısımdaki toplama tüpleri atıldı ve filtreli kolonların altlarına 1,5 ml'lik ephendorf tüp koyuldu.
- Filtreli spin kolonlara 50 µl Elution buffer eklendi ve 1 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Filtreye takılı DNA Elution buffer ile ephendorf tüp içine aktarılmış oldu.

- DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometre (DENOVIX DS-11 FX, ABD) ile ölçüldü.
- DNA örnekleri WES analizinde kullanılmak üzere -20ºC'de saklandı.

Ekstraksiyonu ve kalite kontrolü yapılarak sekans için uygun olan 10 hasta bireyin DNA örnekleri ile Illumina NovaSeq 6000 Sequencing System kullanılarak uygun prosedürlerde tüm ekzon dizileme yapıldı. Uygulanan basamaklar; Fragmantasyon, Uç onarımı ve A-ilavesi, Adaptör ligasyonu ve Kütüphane amplifikasyonunu içermektedir.

IgH geni kromozom 14q32.3'te lokalizedir. Yaklaşık 1250 kb alan kaplar. Toplam 46-52 VH segmenti tanımlanmıştır. Çalışmamızda IgVH mutasyon durumunun analizi için bu bölgeler incelendi.

### 3.2.4. Tam Kandan Total RNA İzolasyonu

Hastalardan alınan kan örneklerinden total RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolasyonu aşamaları aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

- EDTA'lı kan tüpünden 2 ml'lik ependorf tüpe 500 µl kan alındı.
- 1000 µl trizol eklendi ve peletin çözünmesi için vortekslendi.
- Üzerine 200 µl kloroforom eklendi ve vortekslendi.
- +4 $^{0}$C'de 13000 rpm hızla 15 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant kısım temiz ependorf tüplere aktarıldı ve üzerine 500 µl izopropil alkol eklenerek 5-10 dk sürekli alt üst edildi.
- +4 $^{0}$C'de 13000 rpm hızla 10 dakika santrifüj edildi.
- Üst kısım döküldü ve üzerine 1000 µl % 75'lik etil alkol eklendi.
- +4 $^{0}$C'de 12000 rpm hızla 5 dakika santrifüj edildi.
- Üst kısım döküldü ve ependorf tüplerin ağzı açık bırakılarak oda ısısında kurutuldu.
- Üzerine 50 µl RNase Free Water eklenerek RNA çözdürüldü.
- RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometre (DENOVIX DS-11 FX, ABD) ile ölçüldü.

- Elde edilen RNA, çalışma yapılana kadar -80 $^0$C'de saklandı.

### 3.2.5. cDNA Eldesi

RNA örneklerinden cDNA sentezi için RT$^2$ First Strand Kit (Qiagen, Germany) kullanıldı. Kit protokolüne göre cDNA sentezi iki aşamalı olarak gerçekleştirildi.

- Her RNA örneği için Tablo 3.4'e göre genomic DNA elimination miks'i hazırlandı ve pipetleme yapılarak hafifçe karıştırıldı.

**Tablo 3. 4:** Genomic DNA elimination miks

| Reaksiyon Bileşenleri | Kullanılan Miktar |
|---|---|
| GE Buffer | 2 µl |
| Nuclease free water | 6 µl |
| RNA | 2 µl |
| **Toplam** | **10 µl** |

- Genomic DNA elimination miks'i 42 $^0$C'de 5 dakika inkübe edildi ve sonrasında hızlıca buz üzerine alınarak 1 dakika buz üzerinde bekletildi.
- Tablo 3.5'e göre reverse-transcription miks'i hazırlandı.

**Tablo 3. 5:** Reverse-transcription miks

| Reaksiyon Bileşenleri | Kullanılan Miktar |
|---|---|
| 5x Buffer BC3 | 4 µl |
| Control P2 | 1 µl |
| R3 Reverse Transcriptase Mix | 2 µl |
| Nuclease free water | 3 µl |
| **Toplam** | **10 µl** |

- 10 µl genomic DNA elimination miks'i içeren her tüpe 10 µl reverse-transcription miks'i eklendi. Pipetleyerek hafifçe karıştırıldı.
- 37 $^{0}$C'de 60 dakika inkübe edildi. Ardından 95 $^{0}$C'de 5 dakika inkübe edilerek reaksiyon durduruldu.
- Elde edilen cDNA örnekleri çalışma yapılana kadar -20 $^{0}$C'ye kaldırıldı.

### 3.2.6. PCR Optimizasyonu ve Gen Ekspresyon Seviyelerinin Analizi

Real-time PCR reaksiyonları, RT$^{2}$ SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen, Germany) kullanılarak gerçekleştirildi.

Çalışmaya başlamadan önce, kullanılacak cDNA'ların dilüsyon oranlarını (undilue, 1/10, 1/25 ve 1/125) belirlemek amacıyla cDNA kontrol PCR'ı yapıldı ve melting curve analizi ile kontrol edilerek gerekli dilüsyon oranları belirlendikten sonra çalışmada kullanıldı. Kontrol PCR'ı sonrasında cDNA dilüsyon oranı 1/10 olarak belirlendi. cDNA kontrol PCR'ı ile FCRL gen ailesi ve ZAP70 gen ekspresyon seviyelerinin tespiti için Real-time PCR reaksiyon bileşenleri Tablo 3.6'ya göre hazırlandı.

**Tablo 3. 6:** Real-time PCR reaksiyon bileşenleri

| Reaksiyon Bileşenleri | Kullanılan Miktar |
|---|---|
| RT$^{2}$ SYBR Green Mastermix | 5 µl |
| RNase free water | 2 µl |
| RT$^{2}$ qPCR Primer Assay | 1 µl |
| cDNA | 2 µl |
| **Toplam** | **10 µl** |

Deneyler, LightCycler® 480-II Instrument 96 or 384 well plate (Roche, Switzerland) cihazı kullanılarak Tablo 3.7'deki termal döngü koşullarında üç tekrar halinde gerçekleştirildi. PCR özgüllüğü, melting curve analizi ile doğrulandı.

**Tablo 3. 7:** Real-time PCR termal döngü koşulları

| | Sıcaklık | Zaman | |
|---|---|---|---|
| Pre-incubation | 95 $^0$C | 10 dk | |
| Amplification | 95 $^0$C | 15 sn | 45 cycle |
| | 60 $^0$C | 1 dk | |
| | 72 $^0$C | 5 sn | |
| Melting Curve | 95 $^0$C | 5 sn | |
| | 65 $^0$C | 1 dk | |
| | 97 $^0$C | Continuous | |
| Cooling | 40 $^0$C | 30 sn | |

### 3.2.7. İstatistik Analiz

Elde edilen verilerin istatistiki olarak değerlendirilmesinde SPSS (version 25.0) programı kullanıldı. Proje sonucunda elde edilen klinik, biyokimyasal ve demografik veriler bir araya getirildi. Sürekli değişkenlerin analizinde dağılım ve varyans homojenliğini araştırmak için Shapiro-Wilk testi ve Levene testi kullanıldı. Parametrik sürekli değerler t-testi ve ANOVA ile, parametrik olmayan değişkenler ise Mann-Whitney U ve Kruskal-Wallis testleri ile karşılaştırıldı. Kategorik değişkenler ki kare testleri ile analiz edildi. Ekspresyon verileri ile klinik parametreler arasındaki önemli korelasyonlar, Pearson korelasyon katsayısı hesaplanarak değerlendirildi. Elde edilen veriler istatistiki olarak $p \leq 0.05$ olarak anlamlandırıldı.

Gen ekspresyon analizi sonucu elde edilen veriler, GeneGlobe Data Analysis Center (https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze) tarafından geliştirilen çevrimiçi bir yazılım programı ile analiz edildi. Her mRNA'nın ekspresyon seviyeleri, Ct (Threshold Cycle) değeri kullanılarak değerlendirildi. Bu sonuçlar, her örnek için housekeeping genler kullanılarak normalize edildi (ΔCt). Her iki grup arasındaki kat değişimleri (fold change) ΔΔCt olarak hesaplandı. Her iki grup karşılaştırıldığında mRNA genlerinin diferansiyel ekspresyonu $2^{-\Delta\Delta Ct}$ olarak ifade edildi (113).

### 3.2.8. Biyoinformatik Analiz

WES çalışması sonucu elde edilen verilerden IgVH somatik hipermutasyon durumunun tespiti için IMGT/HighV-QUEST analiz aracı (ImMunoGeneTics; http://imgt.org) kullanıldı. %98'e eşit ve daha küçük diziler, homoloji mutasyonları olarak kabul edildi. Ayrıca patojenik varyantların tespiti ve diğer varyantların hastalıkla ilişkilendirilmesi için ClinVar veri tabanı kullanıldı. Sonuçlar Ilyome Bioscience (Ilyome; http://ilyome.com) programıyla analiz edildi.

# 4. BULGULAR

## 4.1. KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ HASTALARININ KLİNİK VE GENETİK SONUÇLARI

### 4.1.1. Klinik Değerlendirme Sonuçları

Çalışmamıza İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları A.B.D., Hematoloji BD.' da, Hematoloji Uzmanı tarafından 3 ayda bir değerlendirilen ve tedavi almayan 18 yaşından büyük 60 KLL hastası dahil edildi.

Çalışmamıza katılan hastaların %50'si kadın, %50'si erkek iken, ortalama yaşları 65,28 olarak bulundu. Hastaların ortalama β2-M değeri 3,52 ve ortalama LDH değeri 214,57 olarak tespit edildi (Tablo 4.1).

**Tablo 4. 1:** Hastaların demografik verileri ile serum β2-M ve LDH sonuçları

| **Cinsiyet** | **(N=60)** | | **%** | |
|---|---|---|---|---|
| Kadın | 30 | | 50 | |
| Erkek | 30 | | 50 | |
| | **Ortalama** | **Minimum** | **Maksimum** | **Standart Sapma (±)** |
| **Yaş** | 65,28 | 30 | 89 | 10,69 |
| **β2-M** | 3,52 | 1,71 | 13,43 | 1,78 |
| **LDH** | 214,57 | 121 | 925 | 118 |

Tanı anında hastaların %33,3'ü Rai evreleme sistemine göre Rai II evresinde ve Binet evreleme sistemine göre ise %43,3'ü Binet B evresindeydi (Tablo 4.2).

**Tablo 4. 2:** Hastaların evreleme sonuçları

| Evreleme | | |
|---|---|---|
| **Rai** | **N** | **%** |
| 0 | 11 | 18,3 |
| I | 16 | 26,7 |
| II | 20 | 33,3 |
| III | 8 | 13,3 |
| IV | 5 | 8.3 |
| **Binet** | **N** | **%** |
| A | 24 | 40 |
| B | 26 | 43,3 |
| C | 10 | 16,7 |

WES analizi yapılan 10 hastanın KLL-IPI skorlama sonuçları Tablo 4.3'te verilmiştir. Skorlamada belirtilen puanlar sırasıyla; yaş, klinik evre, serum β2-M düzeyi, IgVH somatik hipermutasyon durumu ve TP53 delesyonu ve/veya mutasyonu (TP53 disfonksiyonu)'nu temsil etmektedir. Skorlama sonuçlarına göre iki hasta 'çok yüksek riskli' olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 4. 3:** WES analizi yapılan hastaların KLL-IPI skorlama sonuçları

| KLL-IPI Skoru | | |
|---|---|---|
| **Hasta** | **Skorlama** | **Puan** |
| **KTF1** | 0+1+0+2+0 | 3 (Orta dereceli risk) |
| **KTF4** | 1+1+0+0+0 | 2 (Orta dereceli risk) |
| **KTF8** | 1+1+2+0+4 | 8 (Çok yüksek risk) |
| **KTF9** | 1+0+2+0+4 | 7 (Çok yüksek risk) |
| **KTF10** | 0+1+0+2+0 | 3 (Orta dereceli risk) |
| **KTF12** | 0+0+0+0+0 | 0 (Düşük risk) |
| **KTF13** | 1+1+2+0+0 | 4 (Yüksek risk) |
| **KTF15** | 1+0+0+2+0 | 3 (Orta dereceli risk) |

**Tablo 4.3** (devam)

| | | |
|---|---|---|
| **KTF16** | 0+1+2+2+0 | 5 (Yüksek risk) |
| **KTF21** | 0+1+2+0+0 | 3 (Orta dereceli risk) |

≤1 Düşük risk, 2-3 Orta dereceli risk, 4-6 Yüksek risk, ≥ 7 Çok yüksek risk

Hastaların Rai evresi ile serum belirteçleri olan β2-M ve LDH seviyeleri karşılaştırıldı. Rai evresi ile β2-M seviyeleri arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki bulundu (p=0,001). Rai evresi ile LDH seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi (p=0,138) (Tablo 4.4).

**Tablo 4. 4:** Hastaların Rai evresi ile serum belirteçlerinin karşılaştırılması

| | **β2-M** | | | **LDH** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **N** | **Ort (Min-Max)** | **p değeri** | **N** | **Ort (Min-Max)** | **p değeri** |
| **Rai 0** | 11 | 2,32 (1,82-2,98) | | 11 | 169,00 (141-196) | |
| **Rai I** | 14 | 2,97 (1,71-4,80) | | 16 | 196,88 (121-396) | |
| **Rai II** | 20 | 3,25 (1,78-5,43) | **0,001*** | 20 | 220,60 (133-925) | 0,138 |
| **Rai III** | 8 | 6,02 (4,54-13,43) | | 8 | 277,25 (153-409) | |
| **Rai IV** | 4 | 5,14 (4,17-6,03) | | 5 | 247 (144-477) | |

Hastaların Rai evresi ile CD38 ve WBC seviyeleri karşılaştırıldı. Rai evresi ile WBC seviyeleri arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki bulundu (p=0,004). Rai evresi ile CD38 seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi (p=0,425) (Tablo 4.5).

**Tablo 4. 5:** Hastaların Rai evresi ile CD38 ve WBC seviyelerinin karşılaştırılması

| | CD38 | | | WBC | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **N** | **Ort (Min-Max)** | **p değeri** | **N** | **Ort (Min-Max)** | **p değeri** |
| **Rai 0** | 10 | 13,58 (2,23-68,10) | | 11 | 26,17 (8,90-58,21) | |
| **Rai I** | 15 | 8,44 (1,27-37,30) | | 16 | 25,56 (12,49-64,30) | |
| **Rai II** | 18 | 14,20 (0,60-71,30) | 0,425 | 20 | 77,23 (11,80-314,20) | **0,004*** |
| **Rai III** | 8 | 13,73 (0,04-54,80) | | 8 | 110,09 (22,70-313,90) | |
| **Rai IV** | 5 | 3,16 (0,20-7,80) | | 5 | 62,19 (6,47-123,20) | |

Hastaların Binet evresi ile serum belirteçleri olan β2-M ve LDH seviyeleri karşılaştırıldı. Binet evresi ile β2-M seviyeleri arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki bulundu (p=0,001). Binet evresi ile LDH seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi (p=0,058) (Tablo 4.6).

**Tablo 4. 6:** Hastaların Binet evresi ile serum belirteçlerinin karşılaştırılması

| | β2-M | | | LDH | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **N** | **Ort (Min-Max)** | **p değeri** | **N** | **Ort (Min-Max)** | **p değeri** |
| **Binet A** | 24 | 2,76 (1,71-5,43) | | 24 | 175,08 (121-279) | |
| **Binet B** | 24 | 3,73 (1,81-13,43) | **0,001*** | 26 | 241,19 (133-925) | 0,058 |
| **Binet C** | 9 | 5,03 (4,17-6,03) | | 10 | 240,10 (144-477) | |

Hastaların Binet evresi ile CD38 ve WBC seviyeleri karşılaştırıldı Binet evresi ile WBC seviyeleri arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki bulundu (p=0,014). Binet evresi ile CD38 seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi (p=0,502) (Tablo 4.7).

**Tablo 4. 7:** Hastaların Binet evresi ile CD38 ve WBC seviyelerinin karşılaştırılması

| | **CD38** | | | **WBC** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **N** | **Ort (Min-Max)** | **p değeri** | **N** | **Ort (Min-Max)** | **p değeri** |
| **Binet A** | 23 | 11,78 (1,27-68,10) | 0,502 | 24 | 39,64 (8,90-314,20) | **0,014*** |
| **Binet B** | 23 | 11,80 (0,04-71,30) | | 26 | 72,79 (11,80-313,90) | |
| **Binet C** | 10 | 10,13 (0,20-54,80) | | 10 | 58,91 (6,47-123,20) | |

Çalışmamıza katılan hastalardan alınan kan örnekleri ile biyokimyasal parametrelere bakıldı. Sonuçlar Tablo 4.8 ve Tablo 4.9'de verilmiştir.

**Tablo 4. 8:** KLL hastalarının biyokimyasal sonuçları

| Test | Ortalama | Standart Sapma (±) | Minimum | Maksimum |
|---|---|---|---|---|
| IgA | 145,42 | 97,24 | 12,5 | 374,9 |
| IgG | 920,71 | 293,04 | 118 | 1653 |
| IgM | 75,55 | 174,18 | 3,6 | 1288,7 |
| CRP | 5,51 | 14,54 | 0,29 | 109,87 |
| Üre | 15,17 | 1,96 | 12,30 | 22,50 |
| Ürik Asit | 5,07 | 1,30 | 2,7 | 9,0 |
| Kreatinin | 0,85 | 0,21 | 0,55 | 1,65 |
| Total Protein | 6,84 | 0,59 | 5,10 | 8,00 |
| Albümin | 4,47 | 0,354 | 3,22 | 5,28 |
| AST | 19,56 | 7,70 | 9,8 | 60 |
| ALT | 17,80 | 14,99 | 8,10 | 118,70 |
| ALP | 85,03 | 25,33 | 38 | 163 |
| GGT | 19,51 | 12,60 | 6 | 89 |
| Sedimentasyon | 10,68 | 10,34 | 3 | 55 |
| Glukoz | 107,67 | 30,30 | 76 | 220 |
| BUN | 17,12 | 6,24 | 7,6 | 34,30 |
| Total Biluribin | 0,44 | 0,27 | 0,13 | 1,96 |
| CKD-EPI | 83,39 | 18,06 | 37 | 122 |
| Demir | 69,48 | 27,60 | 19,70 | 185,30 |
| Ferritin | 91,18 | 126,25 | 12,30 | 825 |
| Vitamin B12 | 39,90 | 200,70 | 129 | 1082 |
| Folat | 9,43 | 4,43 | 4 | 20 |
| Kalsiyum | 9,34 | 0,42 | 8,39 | 10,50 |
| Sodyum | 140,81 | 2,43 | 134 | 145 |
| Potasyum | 4,60 | 0,44 | 3,44 | 6,21 |
| Klor | 177,72 | 122,05 | 96,0 | 1016,0 |
| Magnezyum | 0,85 | 0,07 | 0,69 | 1,02 |
| Fosfor | 3,30 | 0,57 | 1,79 | 4,50 |

**Tablo 4. 9:** KLL hastalarının hemogram sonuçları

| Test | Ortalama | Standard Sapma (±) | Minimum | Maksimum |
|---|---|---|---|---|
| WBC | 57,22 | 66,79 | 6,47 | 314,20 |
| RBC | 4,38 | 0,61 | 2,93 | 5,60 |
| HGB | 12,26 | 1,70 | 8,80 | 15,70 |
| HCT | 38,19 | 4,61 | 29,50 | 47,60 |
| MCV | 87,63 | 6,60 | 64,00 | 101,70 |
| MCH | 28,11 | 2,45 | 20,00 | 32,40 |
| MCHC | 32,07 | 1,26 | 28,70 | 34,40 |
| RDW | 15,17 | 1,96 | 12,30 | 22,50 |
| PLT | 202,20 | 80,80 | 47 | 455 |
| MPV | 8,71 | 1,30 | 6,40 | 11,20 |
| PCT | 0,17 | 0,06 | 0,05 | 0,34 |
| PDW | 13,94 | 3,42 | 7,20 | 19,60 |
| Lenfosit | 44,76 | 47,90 | 4,40 | 226,90 |
| Nötrofil | 8,81 | 20,79 | 1,10 | 155,50 |
| Eozinofil | 0,23 | 0,22 | 0 | 1,10 |
| Bazofil | 0,19 | 0,34 | 0 | 2,20 |
| Monosit | 3,36 | 6,89 | 0,10 | 40,70 |
| Lenfosit % | 76,18 | 13,06 | 38,90 | 94,70 |
| Nötrofil % | 17,91 | 12,44 | 2,00 | 53,50 |
| Eozinofil % | 0,73 | 0,72 | 0 | 3 |
| Bazofil % | 0,34 | 0,24 | 0 | 1,30 |
| Monosit % | 4,58 | 3,09 | 0,10 | 16,10 |

### 4.1.2. Flow Sitometri Analizi Sonuçları

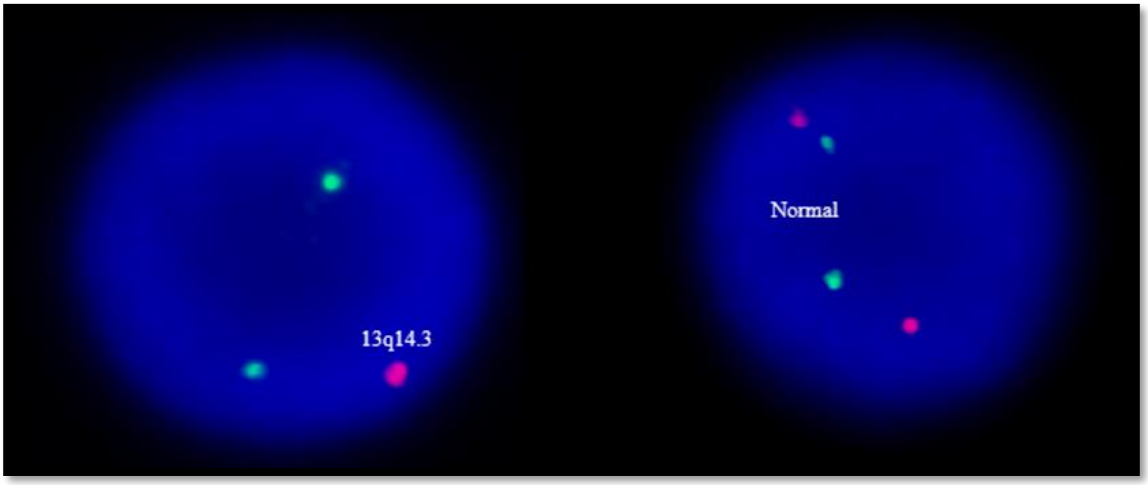
Çalışmamıza katılan hastalardan alınan kan örnekleri ile flow sitometri analizi yapıldı. KLL flow sitometri paneli sonuçları Tablo 4.10'da verilmiştir.

**Tablo 4. 10:** Hastaların flow sitometri analizi sonuçları

| | Ortalama | Standart Sapma (±) | Minimum | Maksimum |
|---|---|---|---|---|
| **CD38** | 11,49 | 16,00 | 0,04 | 71,30 |
| **CD20** | 68,52 | 27,52 | 0,31 | 97,60 |
| **CD79b** | 50,75 | 41,12 | 0,08 | 98,66 |
| **CD2** | 15,33 | 12,04 | 0,44 | 43,90 |
| **CD3** | 11,59 | 10,06 | 0,30 | 46,20 |
| **CD4** | 7,49 | 6,61 | 0,01 | 27,80 |
| **CD5** | 89,38 | 17,55 | 0,60 | 99,70 |
| **CD7** | 14,45 | 11,18 | 0,41 | 42,00 |
| **CD8** | 4,97 | 3,84 | 0,04 | 13,80 |
| **CD10** | 0,21 | 0,26 | 0,00 | 1,64 |
| **CD19** | 84,94 | 12,58 | 45,50 | 99,60 |
| **CD57** | 2,27 | 2,28 | 0,01 | 8,31 |
| **CD56** | 2,96 | 7,22 | 0,01 | 54,10 |
| **CD22** | 65,53 | 31,48 | 0,35 | 99,10 |
| **CD23** | 78,50 | 23,21 | 3,00 | 99,20 |
| **CD16** | 3,33 | 4,18 | 0,10 | 29,80 |

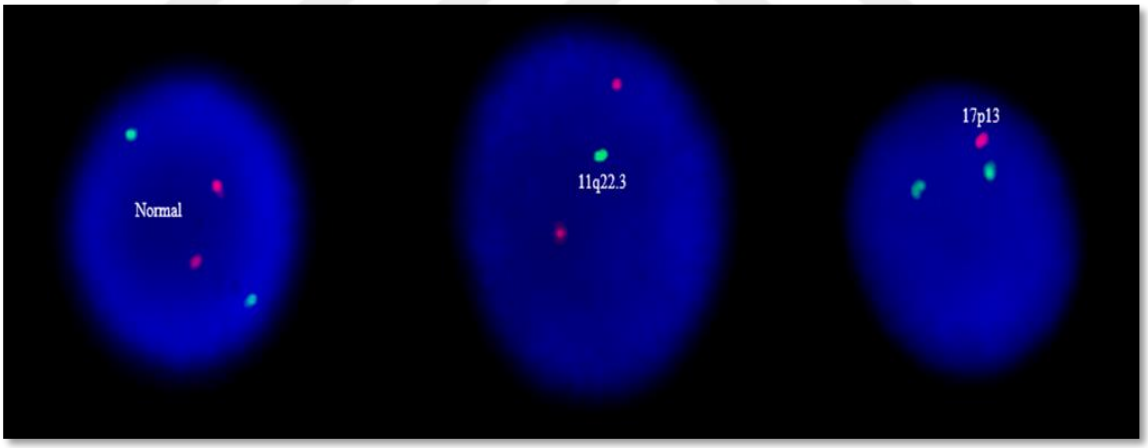
### 4.1.3. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Analizi Sonuçları

Çalışmamıza katılan hastalardan alınan kan örnekleri ile FISH analizi yapıldı (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). FISH analizi sonuçlarına göre hastaların %61,6'sında kromozomal anomali saptandı. 60 hastadan 29'unda (%48,3) del13q14, 2'sinde del11q22 (%3,3), 2'sinde del17p13 (%3,3), 8'inde Trizomi 12 (%13,3), 1'inde del6q23 (%1,7) ve 11'inde del14q32 (%18,3) tespit edildi (Tablo 4.11).



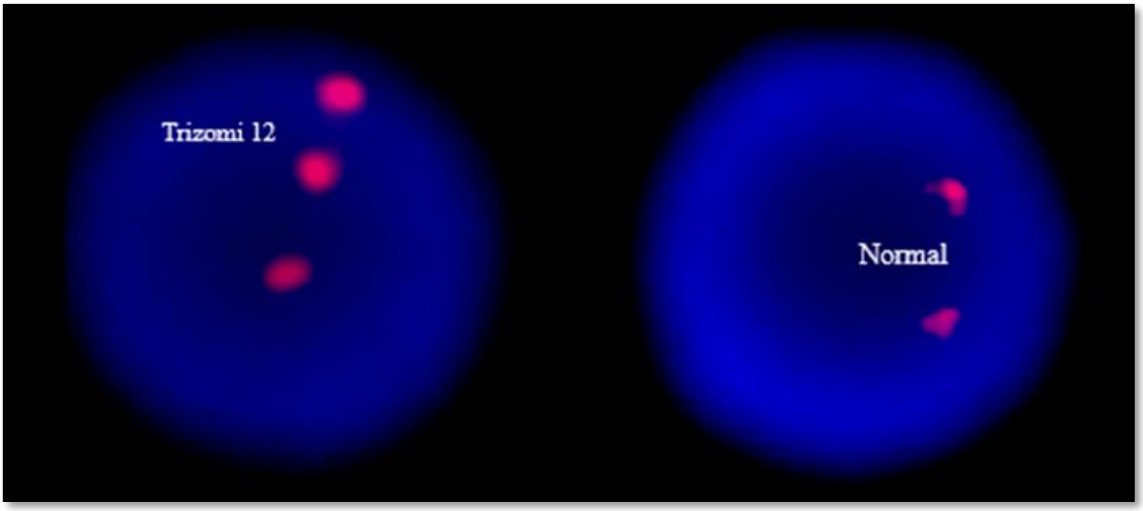

**Şekil 4. 1:** KLL hastalarına ait 13q14.3 delesyonunu gösteren interfaz FISH görüntüsü

13q14.3 delesyonunu tespit etmek için kullanılan bu probda, iki yeşil sinyal 13 no'lu kromozomun sentromer bölgesini, iki kırmızı sinyal ise 13q14.3 bölgesini işaretlemektedir. İki yeşil ve iki kırmızı sinyalin varlığı normal olarak kabul edilmektedir. Kırmızı sinyallerden birinin yokluğu 13q14.3 bölgesinin delesyonunu göstermektedir.



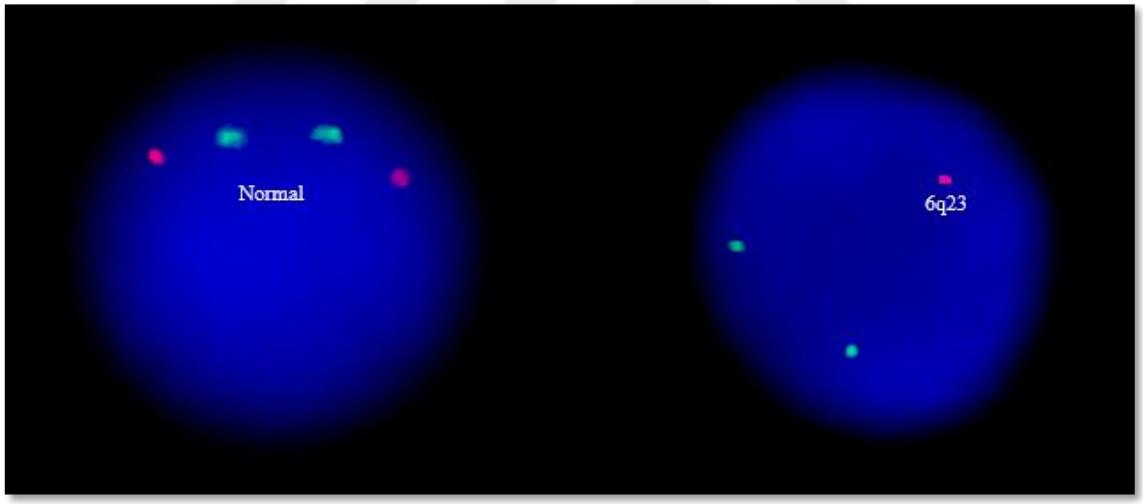

**Şekil 4. 2:** KLL hastalarına ait 11q22.3 ve 17p13 delesyonunu gösteren interfaz FISH görüntüsü

p53 ve ATM delesyonlarını tespit etmek için kullanılan bu probda iki yeşil sinyal 11q22.3 (ATM geni) ve iki kırmızı sinyal 17p13 (p53 geni) bölgesini işaretlemektedir. Yeşil sinyallerden birinin yokluğu 11q22.3 (ATM geni) bölgesinin delesyonunu ve kırmızı sinyallerden birinin yokluğu ise 17p13 (p53 geni) bölgesinin delesyonunu göstermektedir.



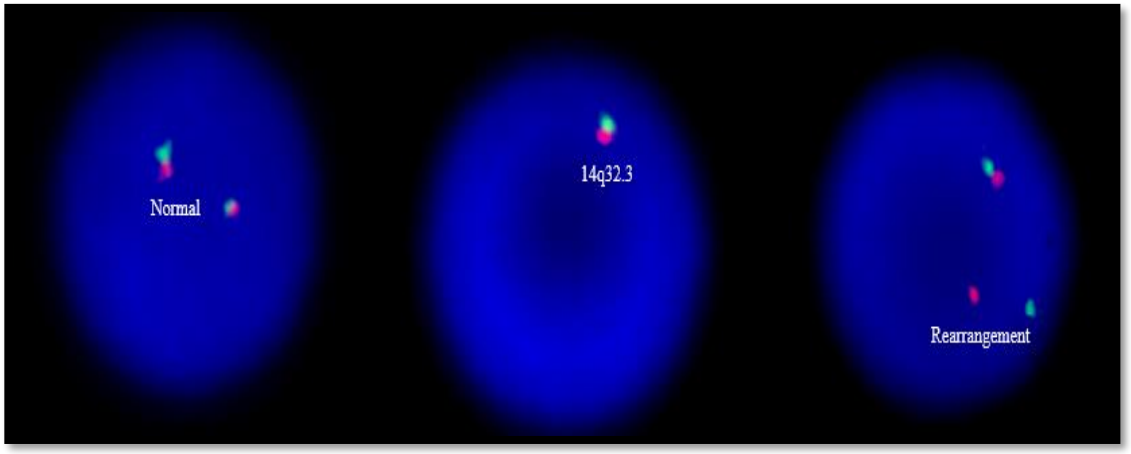

**Şekil 4. 3:** KLL hastalarına ait Trizomi 12'yi gösteren interfaz FISH görüntüsü

Trizomi 12 'yi tespit etmek için kullanılan bu probda, kırmızı sinyaller 12 nolu kromozomun sentromer bölgesini işaretlemektedir. Üç kırmızı sinyal 12 nolu kromozomun trizomisini göstermektedir.




**Şekil 4. 4:** KLL hastalarına ait 6q23 delesyonunu gösteren interfaz FISH görüntüsü

6q23 delesyonunu tespit etmek için kullanılan bu probda, iki yeşil sinyal 6 no'lu kromozomun sentromer bölgesini, iki kırmızı sinyal ise 6q23 bölgesini işaretlemektedir. Kırmızı sinyallerden birinin yokluğu 6q23 (MYB geni) delesyonunu göstermektedir.




**Şekil 4. 5:** KLL hastalarına ait IGH breakapart interfaz FISH görüntüsü

IGH breakapart probda iki kırmızı-yeşil füzyon sinyal 14q32.3 (IGH geni) bölgesini işaretlemektedir ve normal olarak kabul edilmektedir. Bir adet kırmızı-yeşil füzyon sinyal 14q32.3 (IGH geni) delesyonunu göstermektedir. Kırmızı-yeşil füzyonun ayrı olduğu durum ise IGH geninin rearrangement (yeniden düzenlenmesi) yani başka bir partner gen ile translokasyona uğradığını göstermektedir.

**Tablo 4. 11:** Hastaların FISH analizi sonuçları

| **FISH anomalileri** | **N** | **%** |
|---|---|---|
| del13q14 | 29 | 48,3 |
| del11q22 | 2 | 3,3 |
| del17p13 | 2 | 3,3 |
| Trizomi 12 | 8 | 13,3 |
| del6q23 | 1 | 1,7 |
| del14q32 | 11 | 18,3 |
| **Kompleks FISH anomalileri** | **N** | **%** |
| del14q32+del17p13 | 1 | 1,7 |
| del14q32+Trizomi 12 | 2 | 3,3 |
| del14q32+del11q22 | 1 | 1,7 |
| del13q14+Trizomi 12 | 3 | 5 |
| del13q14+del17p13 | 2 | 3,3 |
| del13q14+del14q32 | 7 | 11,7 |
| del13q14+del11q22 | 2 | 3,3 |
| del13q14+del6q23 | 1 | 1,7 |

Hastaların Rai ve Binet evre sonuçları ile kromozomal anomaliler (del13q14, del11q22, del17p13, Trizomi 12, del6q23 ve del14q32) karşılaştırıldı. Rai evresi ile del6q23 ve Binet evresi ile del13q14 arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki tespit edildi (sırasıyla; p=0,02 ve p=0,04) (Tablo 4.12).

**Tablo 4. 12:** Hastaların evreleme sonuçları ile kromozomal anomalilerin karşılaştırılması

| | **Rai Evre** | | | **Binet Evre** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **N** | **Ort-SS** | **p değeri** | **N** | **Ort (Min-Max)** | **p değeri** |
| **del13q14** | 60 | 0,52-0,50 | 0,08 | 60 | 0,52-0,50 | **0,04*** |
| **del11q22** | 60 | 0,97-0,18 | 0,39 | 60 | 0,97-0,18 | 0,33 |
| **del17p13** | 60 | 0,97-0,18 | 0,50 | 60 | 0,97-0,18 | 0,81 |
| **Trizomi 12** | 60 | 0,87-0,34 | 0,19 | 60 | 0,87-0,34 | 0,61 |
| **del6q23** | 60 | 0,98-0,12 | **0,02*** | 60 | 0,98-0,12 | 0,08 |
| **del14q32** | 60 | 0,82-0,39 | 0,59 | 60 | 0,82-0,39 | 0,47 |

### 4.1.4. Tüm Ekzon Dizileme (WES) Analizi Sonuçları

Flow sitometri ve FISH analizi sonrasında immünofenotipik belirteçler kullanılarak belirlenen 10 hastanın WES analizi yapıldı. Hastaların IgVH mutasyon durumu ile klinik ve demografik parametrelerinin karşılaştırılması Tablo 4.13'te verilmiştir.

**Tablo 4. 13:** WES analizi yapılan hastaların IgVH mutasyon durumu ile klinik ve demografik parametrelerinin karşılaştırılması

| Hasta | IgVH Mutasyon Durumu | Yaş | Rai Evre | Binet Evre | KLL-IPI Skoru | CD38 (%) | β2-M | LDH | FISH Anomalileri |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **KTF1** | UM-KLL | 42 | Rai I | Binet B | 3 | 5,4 | 2,06 | 147 | del13q14 |
| **KTF4** | M-KLL | 69 | Rai I | Binet B | 2 | 9,5 | NA | 396 | del13q14 |
| **KTF8** | M-KLL | 77 | Rai III | Binet B | 8 | 10,68 | 4,61 | 153 | del13q14<br>del17p13 |
| **KTF9** | M-KLL | 74 | Rai II | Binet A | 7 | 3,7 | 5,43 | 166 | del13q14<br>del14q32<br>del17p13 |
| **KTF10** | UM-KLL | 50 | Rai I | Binet B | 3 | NA | 1,81 | 154 | Yok |
| **KTF12** | M-KLL | 59 | Rai I | Binet A | 0 | 9,9 | 1,99 | 217 | Yok |
| **KTF13** | M-KLL | 66 | Rai III | Binet C | 4 | 7,6 | 5,65 | 235 | del13q14 |
| **KTF15** | UM-KLL | 80 | Rai II | Binet A | 3 | 4,5 | 2,77 | 145 | Trizomi 12 |
| **KTF16** | UM-KLL | 60 | Rai I | Binet B | 5 | 2,25 | 3,7 | 185 | del13q14 |
| **KTF21** | M-KLL | 62 | Rai II | Binet B | 3 | 2,1 | 3,61 | 164 | del13q14 |

M-KLL: IgVH mutasyonuna sahip KLL hastası, UM-KLL: IgVH mutasyonsuz KLL hastası

KLL-IPI Skoru: ≤1 Düşük risk, 2-3 Orta dereceli risk, 4-6 Yüksek risk, ≥ 7 Çok yüksek risk

Flow sitometri ve FISH analizi sonrasında immünofenotipik belirteçler kullanılarak belirlenen 10 hastanın WES analizi yapıldı. Hastalarda tespit edilen patojenik ve olası patojenik varyantların sonuçları Tablo 4.14 ve Tablo 4.15'te verilmiştir.

**Tablo 4. 14:** WES analizi sonucu bulunan patojenik varyantlar

| Hasta | Gen | Kromozom | Varyasyon | Mutasyon |
|---|---|---|---|---|
| **KTF1** | RARS1 | chr5:168488649 | c.96_97del | Frameshift Variant |
| | OBSCN | chr1:228372729 | c.24822C>A | Stop Gained |
| **KTF8** | FAH | chr15:80168263 | c.554-1G>T | Splice Acceptor Variant |
| **KTF9** | GAA | chr17:80118668 | c.2662G>T | Stop Gained |
| **KTF13** | C11orf80 | chr11:66801039 | c.285dup | Frameshift Variant |
| **KTF15** | SLC7A7 | chr14:22774410 | c.1185_1188del | Frameshift Variant |
| **KTF16** | PEPD | chr19:33464063 | c.549-1G>A | Splice Acceptor Variant |
| **KTF21** | TEX14 | chr17:58585927 | c.2944C>T | Stop Gained |
| | TAF4B | chr18:26293530 | c.1831C>T<br>p.Arg611Ter | Stop Gained<br>Splice Region Variant |
| | STRA6 | chr15:74181385 | c.1594C>T | Stop Gained |

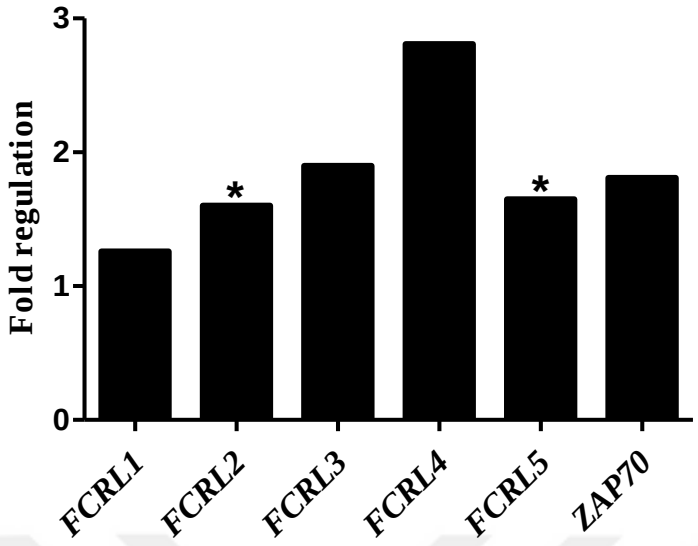
**Tablo 4. 15:** WES analizi sonucu bulunan olası patojenik varyantlar

| Hasta | Gen | Kromozom | Varyasyon | Mutasyon |
|---|---|---|---|---|
| **KTF9** | AK2 | chr1:33013400 | c.500_501insGACAT | Frameshift Variant<br>Splice Region Variant |
| **KTF13** | SERPINF2 | chr17:1745331 | c.103-2A>G | Splice Acceptor Variant |
| **KTF15** | GNB5 | chr15:52184616 | c.61C>T | Stop Gained |
| **KTF16** | CD36 | chr7:80672788 | c.1144C>T | Stop Gained |

### 4.1.5. Gen Ekspresyon Analizi Sonuçları

Kronik lenfositik lösemi hastalarında 6 farklı genin (FCRL1, FCRL2, FCRL3, FCRL4, FCRL5 ve ZAP70) ekspresyon düzeylerini belirlemek için qRT-PCR yöntemi ile mRNA düzeyleri tespit edildi (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).

Çalışmamızın sonucunda, FCRL2 ve FCRL5 genlerinde istatistik olarak anlamlı bir farklılık olduğu tespit edildi (sırasıyla; FCRL2-FR=1,60, FCRL2-p değeri=0,033768; FCRL5-FR=1,65, FCRL5-p değeri= 0,034434) (Şekil 4.6 ve Tablo 4.16).

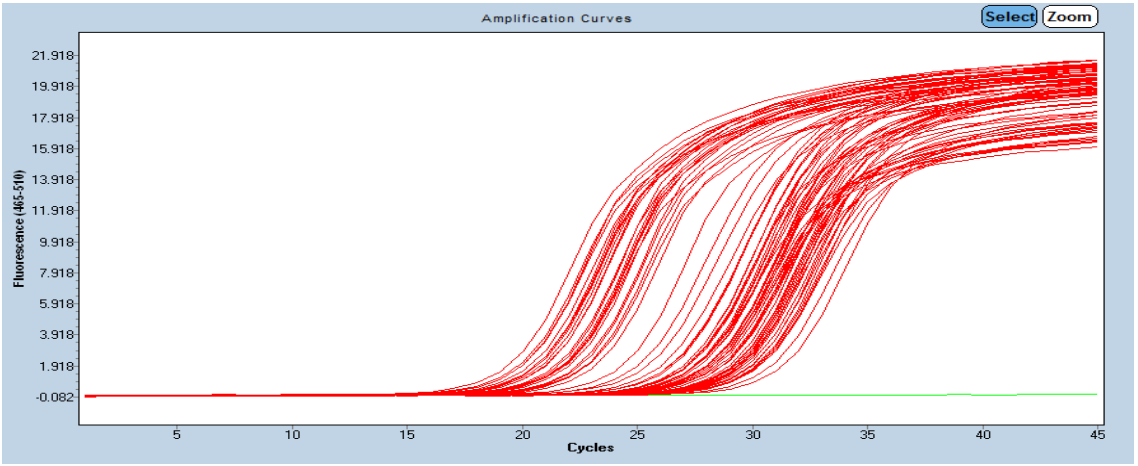



**Şekil 4. 6:** Fold regulation grafiği

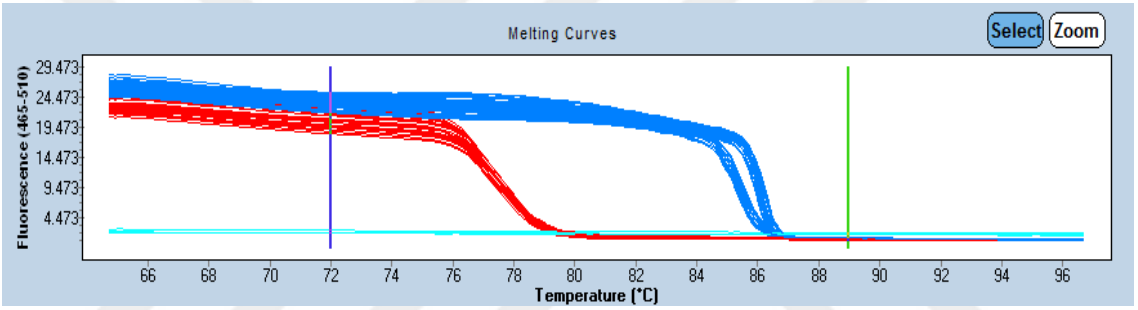
**Tablo 4. 16:** Fold regulation ve p değerleri

| mRNA | Fold regulation | p değeri |
|---|---|---|
| FCRL1 | 1.26 | 0,136 |
| FCRL2 | ***1.60** | ***0,033** |
| FCRL3 | 1.90 | 0,809 |
| FCRL4 | 2.81 | 0,383 |
| FCRL5 | ***1.65** | ***0,034** |
| ZAP70 | 1.81 | 0,288 |

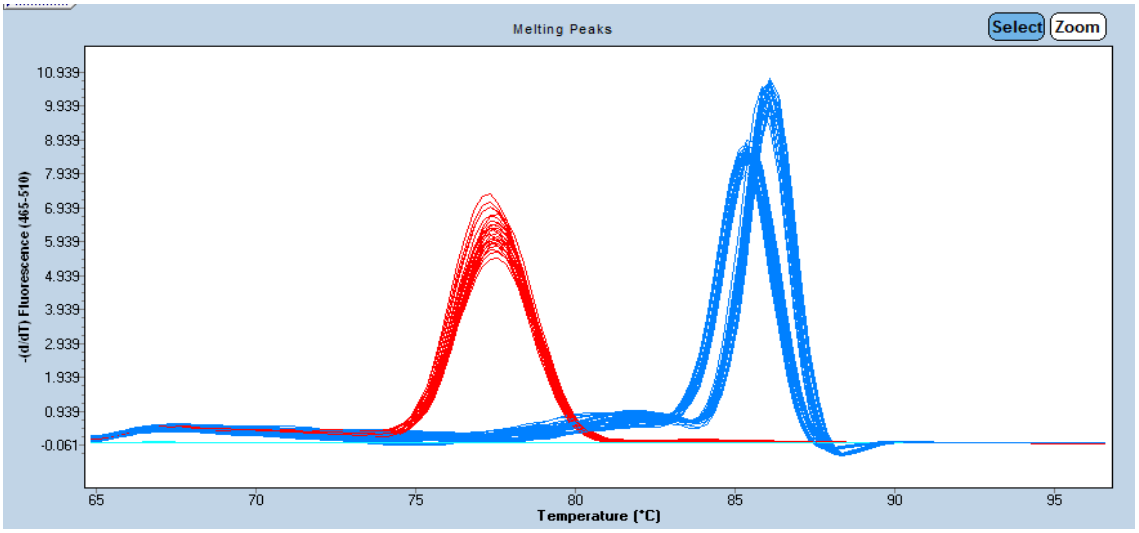
**A)**




**B)**

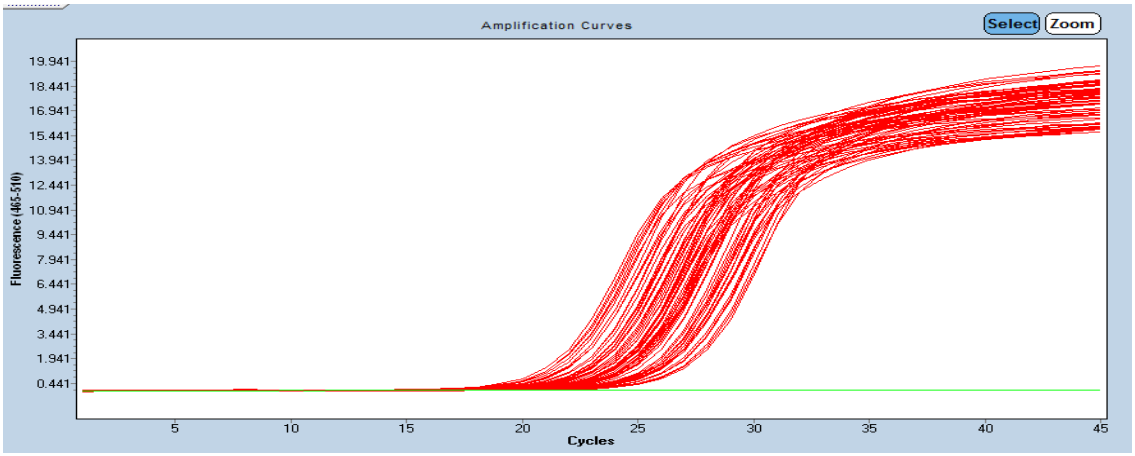



**C)**

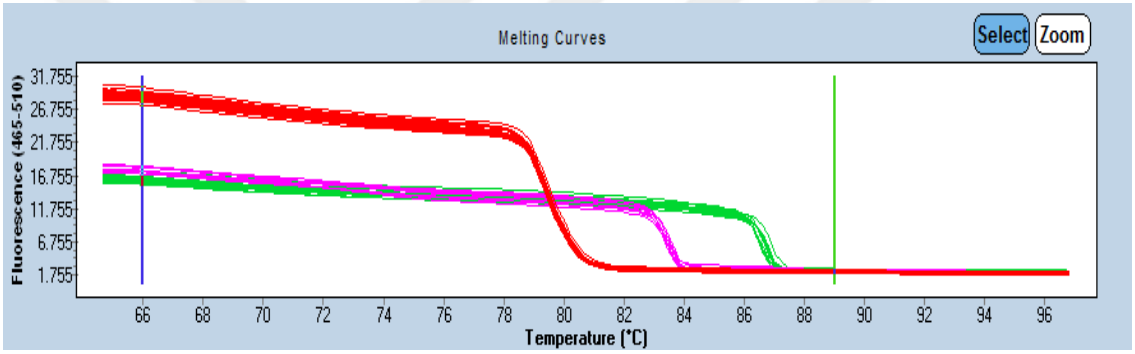



**Şekil 4. 7: A)** FCRL1, FCRL2 ve FCRL3 qRT-PCR Amplifikasyon Eğrisi **B)** FCRL1, FCRL2 ve FCRL3 qRT-PCR Melting Curves **C)** FCRL1, FCRL2 ve FCRL3 qRT-PCR Melting Peaks

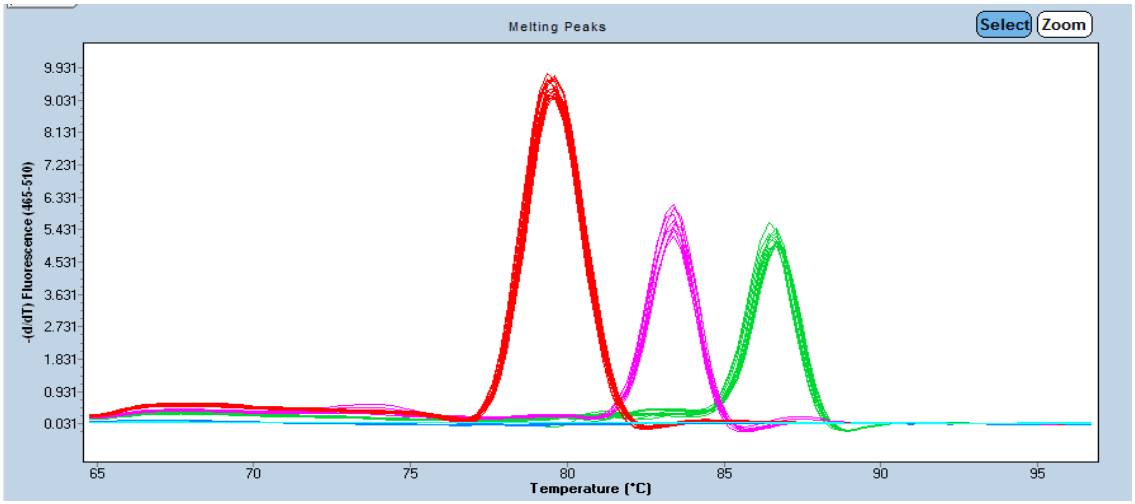
**A)**




**B)**




**C)**




**Şekil 4. 8: A)** FCRL4, FCRL5 ve ZAP70 qRT-PCR Amplifikasyon Eğrisi **B)** FCRL4, FCRL5 ve ZAP70 qRT-PCR Melting Curves **C)** FCRL4, FCRL5 ve ZAP70 qRT-PCR Melting Peaks

# 5. TARTIŞMA

KLL, çoğunlukla sessiz heterojen klinik gidişata sahip bir hastalıktır, ancak bazı vakalarda hızlı ilerlemeyle birlikte daha agresif de olabilir (4). Bu nedenle yüksek riskli hastaların belirlenmesi amacıyla hastalığın prognozunun öngörülmesi oldukça önemli hale gelmiştir.

Son yıllarda, KLL hastalığının prognozunun belirlenmesi, özellikle geleneksel prognostik belirteçlerin genomik teknolojilerle entegrasyonuyla hızla gelişmektedir (114). Klasik olarak FISH ve karyotipleme ile değerlendirilen KLL sitogenetiği ve PCR ile belirlenen IgVH mutasyon durumu günlük pratikte kullanılan en güçlü ve onaylanmış klinik prognostik biyobelirteçlerdir (115). Mutasyona uğramamış IgVH'li KLL hastalarında genellikle del11q ve del17p gibi sitogenetik anomaliler bulunur. Bununla birlikte del13q klasik olarak mutasyona uğramış IgVH ile ilişkilendirilmiştir (116). İzole, iyi (del13q) ve orta riskli sitogenetik anomaliler (trizomi 12 veya negatif FISH) ile KLL'deki IgVH homoloji dizisinin mutasyonel değişiklikleri arasındaki prognostik ilişki hakkındaki bilgiler hala yetersizdir.

KLL'de hastaların klinik seyrini ve bireysel prognozu tahmin etmede yaygın olarak kabul gören Rai ve Binet sistemleri bulunmaktadır (47,48). Rai evreleme sistemine göre, lenfositozu, herhangi bir bölgede büyümüş nodları, splenomegali ve/veya hepatomegalisi olan hastalar, orta riskli hastalığa sahip olarak tanımlanır (48). Binet evreleme sistemine göre, hemoglobin sayısı ≥10 g/dL ve trombosit sayısı ≥100/L olan hastalar A ve B grubundadır (47). Bizim çalışmamızda, tanı anında hastaların %33,3'ü Rai evreleme sistemine göre Rai II evresinde ve Binet evreleme sistemine göre ise %43,3'ü Binet B evresindeydi. Bu oranlar genel olarak literatür ile uyumludur.

Günümüzde, moleküler genetik alanındaki son gelişmeler ile klinik ve laboratuvar temelli Rai ve Binet evreleme sistemlerinin yanında genetik verileri de içeren yeni bir sınıflandırma sistemi kullanılmaya başlanmıştır (50). KLL-IPI olarak adlandırılan bu yeni sınıflandırmada 5 bağımsız prognostik faktörden oluşan ağırlıklı bir derecelendirme kullanılır ve risk grupları 4 farklı kategoriye ayrılır. Çalışmamızda WES analizi yapılan 10 hastada KLL-IPI skorlamasına göre, 2 hasta 'çok yüksek riskli', 2 hasta 'yüksek riskli', 5 hasta 'orta dereceli riskli' ve 1 hasta da 'düşük riskli' olarak tespit edildi.

Bu evreleme sistemlerine ek olarak günümüzde progresyon riski taşıyan KLL hastalarını belirlemede başka birçok belirteç kullanılmaktadır. Bunlar; IgVH somatik hipermutasyon durumu, ZAP70 ve CD38 düzeyi, kromozomal anomaliler (del13q14, del11q22, trizomi 12, del17p13, del14q32 ve del6q23), serum β2-M ve LDH düzeyleri gibi faktörlerdir (7).

Sitogenetik aberasyonlar, KLL hastalarında prognozu öngörmede önemli bilgiler sağlar. Bu amaçla yapılan konvansiyonel sitogenetik analiz ile anomali saptama oranı %40-50 iken, interfaz FISH yöntemi ile bu oran %80-85'e çıkarılmıştır (72). KLL'de FISH analizinde en sık görülen kromozomal anomaliler ve sıklıkları genel olarak 13q14 delesyonu (%50-60), trizomi 12 (%15-20), 11q22.3 (ATM) delesyonu (%5-20), 17p13 delesyonu (%5-10), 14q32 delesyonu (%4-9) ve 6q23 delesyonu (%3-10) olarak bildirilmektedir (117). Kromozom 13q delesyonları, özellikle 13q14 (del[13q14]) bandını içeren delesyonlar, KLL'de en sık görülen sitogenetik anomalilerdir (74). Bizim çalışmamızda da 60 hastada FISH anomalileri değerlendirildi ve literatüre benzer şekilde en sık görülen sitogenetik anomali del13q14 (%48,3) olarak bulundu. Ayrıca çalışmamızda 60 hastadan 2'sinde del11q22 (%3,3), 2'sinde del17p13 (%3,3), 8'inde Trizomi 12 (%13,3), 1'inde del6q23 (%1,7) ve 11'inde del14q32 (%18,3) tespit edildi. Abur ve arkadaşları del13q14 oranını %67 (118), Hu ve ark. %36,5 (119) ve Leeksma ve ark. %58,6 (120) oranında tespit etmişlerdir. Görüldüğü üzere literatürde yer alan çalışmalarda del13q14 görülme oranı diğer tüm kromozomal aberasyonlardan yüksek olmakla birlikte henüz üzerinde ortaklaşılan net bir oran bulunmamaktadır.

Yapılan çalışmalarda 17p13 delesyonu ve 11q22 delesyonunun kötü prognoz, trizomi 12 orta derece prognoz, 13q14 delesyonunun ise iyi prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (117). Hu ve ark. yaptıkları çalışmada mutasyona uğramamış IgVH ($p<0,001$), del(11q) ($p<0,001$) ve trizomi 12 ($p<0,001$) ile ileri Rai ($p=0,05$) ve Binet ($p<0,001$) evreleri karşılaştırıldığında tedaviye kadar geçen süre daha kısa olarak bulundu. Del(17p) olan hastalarda, tedaviye kadar geçen süre daha kısa değildi. Yapılan bu çalışmada, bu anomalilerin erken hastalık ilerlemesinde sınırlı rollere sahip olduğunu ancak nükseden KLL'de daha önemli olduğunu ortaya koymuşlardır (119). Suárez-Cabrera, A. ve ark. tarafından 2022 yılında yayımlanan diğer bir makalede ise 217 KLL hastasında tanı anında prognostik değeri olan moleküler biyobelirteçler (IgVH mutasyon durumu, TP53 mutasyonları ve sitogenetik aberasyonlar) incelenmiştir. Çalışmanın

sonuçlarına göre, orta-yüksek Binet evresi (evre B-C n:43) ile Trizomi 12 arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (p=0,005). Orta-yüksek Binet evresi (evre B-C n:43) ile 17p ve 11q delesyonları arasında bir ilişki tespit edilmemiştir (sırasıyla p=0,077 ve p=0,926) (121). Lai ve ark. nın 2011 yılında yaptığı çalışmada Rai ve Binet evre, WBC, LDH düzeyleri ile del13q14, del11q22 ve del17p ve trizomi 12 karşılaştırılmış, yalnızca del17p ve yüksek Rai ve Binet evresi arasında anlamlı bir ilişkili bulunmuştur (sırasıyla; p=0,006 ve p=0,013). WBC ve LDH düzeyi arasında ise anlamlı bir ilişkili bulunamamıştır. Diğer FISH grupları ile evre, WBC ve LDH düzeyinde ilişki görülmemiştir (122). Bizim çalışmamızda ise hastaların Rai ve Binet evre sonuçları ile kromozomal anomaliler (del13q14, del11q22, del17p13, Trizomi 12, del6q23 ve del14q32) karşılaştırıldı. 60 hastanın sonuçlarına göre, Rai evresi ile del6q23 ve Binet evresi ile del13q14 arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki tespit edildi (sırasıyla; p=0,02 ve p=0,04). Sonuçlarımız literatürdeki verilerle koreledir.

KLL hastalarında, serum β2-M ve LDH seviyeleri hastanın klinik evresini yansıtır ve tümör yüküyle ilişkilendirilir. β2-M ve LDH seviyelerinin yüksek olması kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (70). Yüksek β2-M düzeyi gösteren Binet evre A hastalarında, düşük β2-M düzeyleri olan evre A hastalarına kıyasla progresyonsuz sağkalım (PFS) daha kısadır, bu durum β2-M'nin sessiz hastalığı olan hastalarda ek prognostik bilgi sağladığını gösterir (71). Suárez-Cabrera ve ark. göre yüksek β2-M değeri (>3.5 mg/L) ve orta-yüksek Rai evresi (evre II-IV n:19) arasında önemli bir ilişki bulunmuştur (p<0,001) (121). Bizim çalışmamızda da hastaların Rai ve Binet evresi ile β2-M seviyeleri arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki bulundu (p=0,001). Rai ve Binet evresi ile LDH seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi (sırasıyla; p=0,138 ve p=0,058).

Ayrıca çalışmamızda, Rai ve Binet evresi ile WBC seviyeleri arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur (sırasıyla; p=0,004 ve p=0,014). WBC sayısı daha yüksek olan KLL hastalarının, daha düşük olanlara göre muhtemelen daha erken tedaviye ihtiyaç duyulacağı gösterilmiştir. Heerema ve ark. 2021 yılındaki çalışmasının sonucunda Binet evre A olan KLL hastalarında daha yüksek WBC sayısının bağımsız olarak tedavi süresinin daha kısa olacağını öngördüğünü gösterdi. Daha yüksek bir WBC sayısı daha büyük bir hastalık yüküyle tutarlı olduğundan, bu durum, diğer faktörlerden bağımsız olarak daha fazla hastalık yüküne sahip hastaların daha kısa bir tedaviye kadar geçen süreye sahip olduğu hipoteziyle uyumludur (123).

KLL hastalarının yaklaşık yarısında IgVH somatik hipermutasyonu tespit edilmiştir. IgVH mutasyonu olmayan olguların pregerminal lenfositlerden kaynaklandıkları ve daha agresif bir hastalık, yüksek riskli sitogenetik ve kötü sonuç sergilediği, mutasyonlu olgularda ise hastalığın postgerminal lenfositlerden kaynaklandığı, hastalık seyrinin daha yavaş ve sağ kalımında daha uzun olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (8,9). Çalışmamızda immünofenotipik belirteçler kullanılarak belirlenen 10 hastanın 6'sında (%60) IgVH mutasyonu tespit edilirken (M-KLL), 4'ünde (%40) IgVH mutasyon varlığına rastlanmadı (UM-KLL). Suárez-Cabrera ve ark. yaptıkları çalışmada 109 hastanın IgVH mutasyon durumu tanı anında elde edildi ve hastaların 41'inde (%37,6) IgVH mutasyonuna rastlanmazken 68 hastada (%62,4) IgVH mutasyon varlığı tespit edildi (121). Buna göre sonuçlarımız Suárez-Cabrera ve ark. tarafından yapılan çalışmayla uyumludur. IgVH somatik hipermutasyonu tespit ettiğimiz 6 hastanın 5'inde del13q14 tespit edildi. Bir hastada FISH analizi ile baktığımız kromozomal mutasyonlardan hiçbirine rastlanmazken del13q14 tespit ettiğimiz 5 hastanın 2'sinde del17p13 mutasyon varlığı belirlendi. Literatürde del17p13 kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Özünal ve ark. 2021 yılında yaptıkları çalışmada 17 hastadan 12'sinde TP53 geninde tek nükleotid polimorfizmi tespit edilirken, polimorfizmi olan 12 hastanın 9'unda negatif del17p saptanmıştır (124). IgVH somatik hipermutasyonu tespit ettiğimiz bu hastalarda del17p13 olması mutasyonun TP53 gen bölgesinde olmaması ile ilişkilendirilebilir.

Çalışmamızda ekspresyonunda artış görülen FCRL2 ve FCRL5 genlerinin (sırasıyla; FCRL2-FR=1,60, FCRL2-p değeri=0,033768; FCRL5-FR=1,65, FCRL5-p değeri=0,034434), normal dokulardaki ekspresyonu incelendiğinde en çok lenf nodlarında eksprese edildiği ve her iki genin de hücre yüzey sinyalizasyonu yolağında rol aldığı bilinmektedir. FCRL, bağışıklık hücrelerinin yüzeyinde reseptör görevi gören proteinleri kodlayarak bağışıklık sisteminde rol oynayan bir gen ailesidir. Bu reseptörlerin, bağışıklık tepkisinde yer alan antikorlar ve diğer moleküller ile etkileşime girdiği bilinmektedir. FCRL1-5'in immün modülatör etkileri, bunların ilgili hastalarda hedefe yönelik teşhis, tedavi ve prognoz için aday olma potansiyelini vurgulamaktadır (105). FCRL2 ve FCRL5'in insanlarda olgun B hücreleri üzerinde inhibitör eş reseptör olarak hizmet etme fonksiyonel potansiyeli sergilediği ve B hücrelerinde antijen reseptör aktivasyonunu baskılayabildiği tespit edilmiştir. FCRL1-5'in B hücreleri tarafından ekspresyonu, bu molekülleri lösemiler ve lenfomalar gibi lenfoproliferatif

hastalıklarda ilgili klinik adaylar haline getirmiştir. Monoklonal antikorların (mAb'ler) geliştirilmesinin ardından yapılan çalışmalarda, KLL hücrelerinin yanı sıra malign B hücre hatları kullanarak FCRL yüzey proteini ekspresyonu doğrulanmıştır (107,125). Li ve ark. tarafından yapılan çalışmada, FCRL1-5 ekspresyonunu IgVH mutasyon durumu, CD38 ve ZAP70 ekspresyonu ve 107 KLL örneğinden oluşan bir kohorttan alınan klinik özelliklerle karşılaştırarak, FCRL2'nin hem IgVH mutasyon durumu hem de ilk tedaviye kadar geçen süreyi tahmin etmede anlamlı prognostik değere sahip olduğu gösterildi. Bu çalışmada flow sitometrik analiz sonucunda FCRL2 protein seviyesinin, M-KLL hastalarında UM-KLL hastalarına göre daha yüksek olduğunu tespit edilmiştir (125). Benzer şekilde Shea, L. K. ve ark. 2019 yılında yayınladıkları çalışmada 99 hastada flow sitometrik analiz sonucuna göre FCRL2, olumlu prognozsuz sağkalım ve daha yavaş hastalık seyrine sahip KLL hastaları için bir belirteç olarak tanımlandı (126). Yapılan bu çalışmalara göre FCRL2 geninin flow sitometrik analizi ile, KLL örnekleri lösemik klon tarafından ifade edilen IgVH geninin mutasyon durumuna göre ayrılabilir. FCRL2 ekspresyonu, daha agresif bir hastalık seyri yaşayan mutasyona uğramamış KLL hastalarında yüksek oranda eksprese edilen CD38 ve ZAP70'in tersidir (8,127). FCRL2 gibi düzenleyici proteinlerin ekspresyonunun sadece prognozu öngörmede değil, aynı zamanda hastalığın klinik seyri ve bazı lenfoproliferatif bozuklukların patogenezi üzerinde de fizyolojik etkisi olabilir. Kazemi ve ark. 2009 yılında yaptıkları çalışmada M-KLL hastalarında UM-KLL hastalarına kıyasla yalnızca FCRL3 gen ekspresyonda artış bulmuşlardır (128). Bizim sonuçlarımıza göre ise normal dokulardaki ekspresyonu incelendiğinde en çok lenf nodlarında eksprese edilen ve hücre yüzey sinyal reseptör yolağında yer alan FCRL2 ve FCRL5 genlerinin KLL'de iyi prognostik belirteç olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

# 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Çalışmamıza katılan hastaların %50'si kadın, %50'si erkek iken, ortalama yaşları 65,28 olarak bulundu. Hastaların ortalama β2-M değeri 3,52 ve ortalama LDH değeri 214,57 olarak tespit edildi.
- Çalışmamızda 60 hastada tanı anında hastaların %33,3'ü Rai evreleme sistemine göre Rai II evresinde ve Binet evreleme sistemine göre ise %43,3'ü Binet B evresinde bulundu.
- Çalışmamızda hastaların Rai evresi ile β2-M ve WBC seviyeleri arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki bulundu (sırasıyla; p=0,001 ve p=0,004). Binet evresi ile β2-M ve WBC seviyeleri arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki bulundu (sırasıyla; p=0,001 ve p=0,014).
- Çalışmamızda 60 hastada FISH anomalileri değerlendirildi ve en sık görülen sitogenetik anomali del13q14 (%48,3) olarak bulundu. Ayrıca 60 hastadan 8'inde Trizomi 12 (%13,3), 2'sinde del11q22 (%3,3), 2'sinde del17p13 (%3,3) 11'inde del14q32 (%18,3) ve 1'inde del6q23 (%1,7) tespit edildi. 23 hastada hiçbir sitogenetik anomali saptanmadı.
- Çalışmamızda hastaların Rai ve Binet evre sonuçları ile kromozomal anomaliler (del13q14, del11q22, del17p13, Trizomi 12, del6q23 ve del14q32) karşılaştırıldı. 60 hastanın sonuçlarına göre, Rai evresi ile del6q23 ve Binet evresi ile del13q14 arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki tespit edildi (sırasıyla; p=0,02 ve p=0,04).
- İmmünfenotipik belirteçler kullanılarak belirlenen 10 hastanın 6'sında IgVH somatik hipermutasyonu tespit edilirken (M-KLL), 4'ünde IgVH mutasyon varlığına rastlanmadı (UM-KLL).
- WES analizi yapılan 7 hastada 10 farklı patojenik varyant (RARS1, OBSCN, FAH, GAA, C11orf80, SLC7A7, PEPD, TEX14, TAF4B ve STRA6) tespit edildi.
- WES analizi yapılan 4 hastada 4 olası patojenik varyant (AK2, SERPINF2, GNB5 ve CD36) tespit edildi.
- Çalışmamızın sonucunda, FCRL2 ve FCRL5 genlerinde istatistik olarak anlamlı bir farklılık bulundu (sırasıyla; FCRL2-FR=1,60, FCRL2-p değeri=0,033768; FCRL5-FR=1,65, FCRL5-p değeri=0,034434).

- Sonuç olarak, normal dokulardaki ekspresyonu incelendiğinde en çok lenf nodlarında eksprese edilen ve hücre yüzey sinyal reseptör yolağında yer alan özellikle FCRL2 ve FCRL5 genlerinin IgVH gen mutasyon durumunu ve klinik ilerlemeyi belirlemek üzere KLL' de iyi prognostik belirteç olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Çalışmamızın bu sonucu literatürde ilk olacaktır.

# KAYNAKLAR


1. Moreno, C., & Montserrat, E. (2010). Genetic lesions in chronic lymphocytic leukemia: what's ready for prime time use?. haematologica, 95(1), 12.
2. The Surveillance E, and End Results (SEER) Program of the National Cancer Institute. Cancer Stat Facts: Leukemia—Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). https://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html
3. Goldin, L. R., & Slager, S. L. (2007). Familial CLL: genes and environment. ASH Education Program Book, 2007(1), 339-345.
4. Hus, I., Podhorecka, M., Bojarska-Junak, A., Roliński, J., Schmitt, M., Sieklucka, M., ... & Dmoszyńska, A. (2006). The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. Annals of Oncology, 17(4), 683-690.
5. Amaya-Chanaga, C. I., & Rassenti, L. Z. (2016). Biomarkers in chronic lymphocytic leukemia: Clinical applications and prognostic markers. Best Practice & Research Clinical Haematology, 29(1), 79-89.
6. Schade, U., Bock, O., Vornhusen, S., Jäger, A., Büsche, G., Lehmann, U., & Kreipe, H. (2006). Bone marrow infiltration pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia is related to immunoglobulin heavy-chain variable region mutation status and expression of 70-kd ζ-associated protein (ZAP-70). Human pathology, 37(9), 1153-1161.
7. Gaidano, G., Foà, R., & Dalla-Favera, R. (2012). Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. The Journal of clinical investigation, 122(10), 3432-3438.
8. Damle, R. N. Wasil, T. Fais, F. Ghiotto, F. Valetto, A. Allen, S. L. Buchbinder, A. Bumdan, D. Dittmar, K. Kolitz, J. Lichtman, S. M. Schulman, P. Vinciguerra, V. P. Rai, K. R. Ferrarini, M. Chiorazzi, N. (1999). 'Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia'. Blood, 94:1840-1847.
9. Lin, K. I., Tam, C. S., Keating, M. J., Wierda, W. G., O'Brien, S., Lerner, S., ... & Abruzzo, L. V. (2009). Relevance of the immunoglobulin VH somatic mutation status in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab (FCR) or related chemoimmunotherapy regimens. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 113(14), 3168-3171.
10. Davis, R. S. (2007). Fc receptor-like molecules. Annual review of immunology, 25(1), 525-560.
11. Davis, R. S., Dennis Jr, G., Odom, M. R., Gibson, A. W., Kimberly, R. P., Burrows, P. D., & Cooper, M. D. (2002). Fc receptor homologs: newest members of a remarkably diverse Fc receptor gene family. Immunological reviews, 190(1), 123-136.
12. Davis, R. S., Ehrhardt, G. R., Leu, C. M., Hirano, M., & Cooper, M. D. (2005). An extended family of Fc receptor relatives. European journal of immunology, 35(3), 674-680.
13. Leu, C. M., Davis, R. S., Gartland, L. A., Fine, W. D., & Cooper, M. D. (2005). FcRH1: an activation coreceptor on human B cells. Blood, 105(3), 1121-1126.
14. Mugnaini, E. N., & Ghosh, N. (2016). Lymphoma. Primary Care: Clinics in Office Practice, 43(4), 661-675.
15. Rappaport, H. (1966). Tumors of the hematopoietic system. Armed Forces Institute of Pathology.
16. de Leval, L., & Jaffe, E. S. (2020). Lymphoma classification. The Cancer Journal, 26(3), 176-185.
17. Lennert, K. N. H. E., Mohri, N., Stein, H., & Kaiserling, E. (1975). The histopathology of malignant lymphoma. British Journal of Haematology, 31, 193-203.
18. Stansfeld, A. G., Diebold, J., Kapanci, Y., Kelenyi, G., Lennert, K., Mioduszewska, O., ... & Wright, D. H. (1988). Updated Kiel classification for lymphomas. The Lancet, 331(8580), 292-293.
19. Harris, N. L., Jaffe, E. S., Stein, H., Banks, P. M., Chan, J. K., Cleary, M. L., ... & Gatter, K. C. (1994). A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. blood, 84(5), 1361-1392.
20. Jaffe, E. S. (Ed.). (2001). Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Vol. 3). Iarc.
21. Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., Thiele, J., & Vardiman, J. W. (2008). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Vol. 2, p. 439). S. H. Swerdlow (Ed.). Lyon, France: International agency for research on cancer.

22. Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G. A., Zelenetz, A. D., & Jaffe, E. S. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood, 127(20), 2375–2390. https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569.
23. Turvey, S. E., & Broide, D. H. (2010). Innate immunity. The Journal of allergy and clinical immunology, 125(2 Suppl 2), S24–S32.
24. Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 125(2), S33-S40.
25. Ten Hacken, E., Gounari, M., Ghia, P., & Burger, J. A. (2019). The importance of B cell receptor isotypes and stereotypes in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia, 33(2), 287-298.
26. Tobón, G. J., Izquierdo, J. H., & Cañas, C. A. (2013). B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity—focus on systemic lupus erythematosus. Autoimmune diseases, 2013.
27. Chappell, C. P., & Jacob, J. (2007). Germinal center-derived B cell memory. Crossroads between Innate and Adaptive Immunity, 139-148.
28. Tobin, G. (2007). The immunoglobulin genes: structure and specificity in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia & lymphoma, 48(6), 1081-1086.
29. Chi, X., Li, Y., & Qiu, X. (2020). V (D) J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. Immunology, 160(3), 233-247.
30. Schroeder Jr, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. Journal of allergy and clinical immunology, 125(2), S41-S52.
31. Lefranc, M. P., & Lefranc, G. (2020). Immunoglobulins or antibodies: IMGT® bridging genes, structures and functions. Biomedicines, 8(9), 319.
32. Kipps, T. J., Stevenson, F. K., Wu, C. J., Croce, C. M., Packham, G., Wierda, W. G., ... & Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. Nature reviews Disease primers, 3(1), 1-22.
33. Minici, C., Gounari, M., Übelhart, R., Scarfo, L., Dühren-von Minden, M., Schneider, D., ... & Degano, M. (2017). Distinct homotypic B-cell receptor interactions shape the outcome of chronic lymphocytic leukaemia. Nature communications, 8(1), 15746.
34. Alaggio, R., Amador, C., Anagnostopoulos, I., Attygalle, A. D., Araujo, I. B. D. O., Berti, E., ... & Xiao, W. (2022). The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: lymphoid neoplasms. Leukemia, 36(7), 1720-1748.
35. Campo, E., Jaffe, E. S., Cook, J. R., Quintanilla-Martinez, L., Swerdlow, S. H., Anderson, K. C., ... & Zelenetz, A. D. (2022). The international consensus classification of mature lymphoid neoplasms: a report from the clinical advisory committee. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 140(11), 1229-1253.
36. Wang, K. Y., Shah, P., Skavla, B., Fayaaz, F., Chi, J., & Rhodes, J. M. (2022). Vaccination efficacy in patients with chronic lymphocytic leukemia. Leukemia & Lymphoma, 1-15.
37. Miranda-Filho, A., Piñeros, M., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Monnereau, A., & Bray, F. (2018). Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. The Lancet Haematology, 5(1), e14-e24.
38. Yang, S., Varghese, A. M., Sood, N., Chiattone, C., Akinola, N. O., Huang, X., & Gale, R. P. (2021). Ethnic and geographic diversity of chronic lymphocytic leukaemia. Leukemia, 35(2), 433-439.
39. Brown, J. R. (2013). Inherited susceptibility to chronic lymphocytic leukemia: evidence and prospects for the future. Therapeutic advances in hematology, 4(4), 298-308.
40. Kasim, K., Levallois, P., Abdous, B., Auger, P., Johnson, K. C., & Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. (2005). Environmental tobacco smoke and risk of adult leukemia. Epidemiology, 672-680.
41. Lu, Y., Wang, S. S., Reynolds, P., Chang, E. T., Ma, H., Sullivan-Halley, J., ... & Bernstein, L. (2011). Cigarette smoking, passive smoking, and non-Hodgkin lymphoma risk: evidence from the California Teachers Study. American journal of epidemiology, 174(5), 563-573.
42. Tsai, H. T., Cross, A. J., Graubard, B. I., Oken, M., Schatzkin, A., & Caporaso, N. E. (2010). Dietary factors and risk of chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma: a pooled analysis of two prospective studies. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention, 19(10), 2680-2684.
43. Slager, S. L., Benavente, Y., Blair, A., Vermeulen, R., Cerhan, J. R., Costantini, A. S., ... & de Sanjosé, S. (2014). Medical history, lifestyle, family history, and occupational risk factors for chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. Journal of the National Cancer Institute Monographs, 2014(48), 41-51.

44. Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., ... & Kipps, T. J. (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 111(12), 5446-5456.
45. Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N., & Pasternack, B. S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia.
46. Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguet, H., Goasguen, J., ... & Gremy, F. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer, 48(1), 198-206.
47. Rai, K. (1987). A critical analysis of staging in CLL. Chronic Lymphocytic Leukemia, Recent Progress and Future Directions, 253-264.
48. Hallek, M., & Al-Sawaf, O. (2021). Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. American journal of hematology, 96(12), 1679-1705.
49. Pflug, N., Bahlo, J., Shanafelt, T. D., Eichhorst, B. F., Bergmann, M. A., Elter, T., ... & Hallek, M. (2014). Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 124(1), 49-62.
50. Cramer, P., & Hallek, M. (2011). Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia—what do we need to know?. Nature reviews Clinical oncology, 8(1), 38-47.
51. International CLL-IPI Working Group. (2016). An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. The Lancet Oncology, 17(6), 779-790.
52. Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., ... & Kipps, T. J. (2018). iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 131(25), 2745-2760.
53. Eichhorst, B., Robak, T., Montserrat, E., Ghia, P., Niemann, C. U., Kater, A. P., ... & Mey, U. (2021). Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology, 32(1), 23-33.
54. https://www.thd.org.tr/thdData/Books/83/kilavuzu-tek-parca-halinde-goruntulemek-icin-tiklayiniz.pdf (Erişim tarihi: 14.02.2024).
55. Teng, G., & Papavasiliou, F. N. (2007). Immunoglobulin somatic hypermutation. Annu. Rev. Genet., 41, 107-120.
56. Peled, J. U., Kuang, F. L., Iglesias-Ussel, M. D., Roa, S., Kalis, S. L., Goodman, M. F., & Scharff, M. D. (2008). The biochemistry of somatic hypermutation. Annu. Rev. Immunol., 26, 481-511.
57. Montserrat, E., Bauman, T., & Delgado, J. (2016). Present and future of personalized medicine in CLL. Best Practice & Research Clinical Haematology, 29(1), 100-110.
58. Wierda, W. G., Byrd, J. C., Abramson, J. S., Bilgrami, S. F., Bociek, G., Brander, D., ... & Sundar, H. (2020). Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma, version 4.2020, NCCN clinical practice guidelines in oncology. Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 18(2), 185-217.
59. Parikh, S. A., & Shanafelt, T. D. (2016). Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. In Seminars in oncology (Vol. 43, No. 2, pp. 233-240). WB Saunders.
60. Parikh, S. A., Strati, P., Tsang, M., West, C. P., & Shanafelt, T. D. (2016). Should IGHV status and FISH testing be performed in all CLL patients at diagnosis? A systematic review and meta-analysis. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 127(14), 1752-1760.
61. Chan, A. C., Iwashima, M., Turck, C. W., & Weiss, A. (1992). ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR ζ chain. Cell, 71(4), 649-662.
62. Negishi, I., Motoyama, N., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Senju, S., Hatakeyama, S., ... & Loh, D. Y. (1995). Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. Nature, 376(6539), 435-438.
63. Efremov, D. G., Gobessi, S., & Longo, P. G. (2007). Signaling pathways activated by antigen-receptor engagement in chronic lymphocytic leukemia B-cells. Autoimmunity reviews, 7(2), 102-108.
64. Rosenwald, A., Alizadeh, A. A., Widhopf, G., Simon, R., Davis, R. E., Yu, X., ... & Staudt, L. M. (2001). Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. The Journal of experimental medicine, 194(11), 1639-1648.
65. Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., ... & Montserrat, E. (2003). ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. New England Journal of Medicine, 348(18), 1764-1775.

66. Orchard, J. A., Ibbotson, R. E., Davis, Z., Wiestner, A., Rosenwald, A., Thomas, P. W., ... & Oscier, D. G. (2004). ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. The Lancet, 363(9403), 105-111.
67. Rosenquist, R., Cortese, D., Bhoi, S., Mansouri, L., & Gunnarsson, R. (2013). Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand?. Leukemia & lymphoma, 54(11), 2351-2364.
68. Malavasi, F., Deaglio, S., Funaro, A., Ferrero, E., Horenstein, A. L., Ortolan, E., ... & Aydin, S. (2008). Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. Physiological reviews, 88(3), 841-886.
69. Malavasi, F., Deaglio, S., Damle, R., Cutrona, G., Ferrarini, M., & Chiorazzi, N. (2011). CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 118(13), 3470-3478.
70. Sevinc, M., Karabulut, A., Eskazan, A. E., Catal Tatonyan, S., Ozbek, U., & Soysal, T. (2020). The Impact and Prognostic Significance of Chronic Lymphocytic Leukemia Upregulated 1 (CLLU1) Gene Expression in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia: A Single Center Experience. Laboratory Medicine, 51(3), 259-264.
71. Gentile, M., Cutrona, G., Neri, A., Molica, S., Ferrarini, M., & Morabito, F. (2009). Predictive value of β2-microglobulin (β2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. Haematologica, 94(6), 887.
72. Autore, F., Strati, P., Laurenti, L., & Ferrajoli, A. (2018). Morphological, immunophenotypic, and genetic features of chronic lymphocytic leukemia with trisomy 12: a comprehensive review. Haematologica, 103(6), 931.
73. Yang, S. M., Li, J. Y., Gale, R. P., & Huang, X. J. (2015). The mystery of chronic lymphocytic leukemia (CLL): Why is it absent in Asians and what does this tell us about etiology, pathogenesis and biology?. Blood reviews, 29(3), 205-213.
74. Hallek, M. (2019). Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. American journal of hematology, 94(11), 1266-1287.
75. Puiggros, A., Delgado, J., Rodriguez-Vicente, A., Collado, R., Aventin, A., Luno, E., ... & Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH) and Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica (GELLC). (2013). Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion. British journal of haematology, 163(1), 47-54.
76. Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Kröber, A., Bullinger, L., ... & Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. New England Journal of Medicine, 343(26), 1910-1916.
77. https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR15A&keywords=miRNA-15a (Erişim tarihi: 14.02.2024).
78. Klein, U., Lia, M., Crespo, M., Siegel, R., Shen, Q., Mo, T., ... & Dalla-Favera, R. (2010). The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. Cancer cell, 17(1), 28-40.
79. Calin, G. A., Cimmino, A., Fabbri, M., Ferracin, M., Wojcik, S. E., Shimizu, M., ... & Croce, C. M. (2008). MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(13), 5166-5171.
80. Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., ... & Croce, C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(39), 13944-13949.
81. Braga, T. V., Evangelista, F. C. G., Gomes, L. C., da Silva Araújo, S. S., das Graças Carvalho, M., & de Paula Sabino, A. (2017). Evaluation of MiR-15a and MiR-16-1 as prognostic biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. Biomedicine & Pharmacotherapy, 92, 864-869.
82. Gonzalez, D., Martinez, P., Wade, R., Hockley, S., Oscier, D., Matutes, E., ... & Morgan, G. J. (2011). Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. Journal of Clinical Oncology, 29(16), 2223-2229.
83. oM Eid, M. M., Kayed, H. F., Mahmoud, W. M., Mousafa, S. S., Ismail, M. M., & Abdeen, D. M. (2014). Detection of cytogenetics abnormalities in chronic lymphocytic leukemia using FISH technique and their prognostic impact. Risk, 200, 13.
84. Hallek, M. (2015). Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. American journal of hematology, 90(5), 446-460.
85. https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ATM (Erişim tarihi: 14.02.2024).

86. Shahjahani, M., Mohammadiasl, J., Noroozi, F., Seghatoleslami, M., Shahrabi, S., Saba, F., & Saki, N. (2015). Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis. Cellular Oncology, 38, 93-109.
87. https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TP53 (Erişim tarihi: 14.02.2024).
88. Seiffert, M., Dietrich, S., Jethwa, A., Glimm, H., Lichter, P., & Zenz, T. (2012). Exploiting biological diversity and genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia & lymphoma, 53(6), 1023-1031.
89. Zenz, T., Mertens, D., Küppers, R., Döhner, H., & Stilgenbauer, S. (2010). From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. Nature Reviews Cancer, 10(1), 37-50.
90. Rossi, D., Cerri, M., Deambrogi, C., Sozzi, E., Cresta, S., Rasi, S., ... & Gaidano, G. (2009). The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. Clinical cancer research, 15(3), 995-1004.
91. Trbusek, M., Smardova, J., Malcikova, J., Sebejova, L., Dobes, P., Svitakova, M., ... & Mayer, J. (2011). Missense mutations located in structural p53 DNA-binding motifs are associated with extremely poor survival in chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol, 29(19), 2703-8.
92. Bosch, F., & Dalla-Favera, R. (2019). Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. Nature reviews Clinical oncology, 16(11), 684-701.
93. Finn, W. G., Kay, N. E., Kroft, S. H., Church, S., & Peterson, L. C. (1998). Secondary abnormalities of chromosome 6q in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a sequential study of karyotypic instability in 51 patients. American journal of hematology, 59(3), 223-229.
94. https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MYB (Erişim tarihi: 14.02.2024).
95. Wang, D. M., Miao, K. R., Fan, L., Qiu, H. R., Fang, C., Zhu, D. X., ... & Li, J. Y. (2011). Intermediate prognosis of 6q deletion in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia & lymphoma, 52(2), 230-237.
96. Gerrie, A. S., Huang, S. J., Bruyere, H., Dalal, C., Hrynchak, M., Karsan, A., ... & Gillan, T. L. (2014). Population-based characterization of the genetic landscape of chronic lymphocytic leukemia patients referred for cytogenetic testing in British Columbia, Canada: the role of provincial laboratory standardization. Cancer Genetics, 207(7-8), 316-325.
97. https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IGH (Erişim tarihi: 14.02.2024).
98. Harris, R. A., Stevens, J. M., Pickering, D. L., Althof, P. A., Smith, L. M., Sanmann, J. N., & Dave, B. J. (2021). Frequency, variations, and prognostic implications of chromosome 14q32 deletions in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia Research, 110, 106665.
99. Cavazzini, F., Hernandez, J. A., Gozzetti, A., Russo Rossi, A., De Angeli, C., Tiseo, R., ... & Cuneo, A. (2008). Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. British journal of haematology, 142(4), 529-537.
100. Gerrie, A. S., Bruyere, H., Chan, M. J., Dalal, C. B., Ramadan, K. M., Huang, S. J., ... & Gillan, T. L. (2012). Immunoglobulin heavy chain (IGH@) translocations negatively impact treatment-free survival for chronic lymphocytic leukemia patients who have an isolated deletion 13q abnormality. Cancer Genetics, 205(10), 523-527.
101. De Braekeleer, M., Tous, C., Guéganic, N., Le Bris, M. J., Basinko, A., Morel, F., & Douet-Guilbert, N. (2016). Immunoglobulin gene translocations in chronic lymphocytic leukemia: a report of 35 patients and review of the literature. Molecular and Clinical Oncology, 4(5), 682-694.
102. Long, E. O. (1999). Regulation of immune responses through inhibitory receptors. Annual review of immunology, 17(1), 875-904.
103. Ehrhardt, G. R., Leu, C. M., Zhang, S., Aksu, G., Jackson, T., Haga, C., ... & Cooper, M. D. (2007). Fc receptor–like proteins (FCRL): immunomodulators of B cell function. Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation XI: B Cell Biology, 155-162.
104. Matos, M. C., Pinheiro, A., Melo-Ferreira, J., Davis, R. S., & Esteves, P. J. (2021). Evolution of Fc receptor-like scavenger in mammals. Frontiers in Immunology, 11, 590280.
105. Rostamzadeh, D., Kazemi, T., Amirghofran, Z., & Shabani, M. (2018). Update on Fc receptor-like (FCRL) family: new immunoregulatory players in health and diseases. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 22(6), 487-502.
106. Davis, R. S., Wang, Y. H., Kubagawa, H., & Cooper, M. D. (2001). Identification of a family of Fc receptor homologs with preferential B cell expression. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(17), 9772-9777.
107. Polson, A. G., Zheng, B., Elkins, K., Chang, W., Du, C., Dowd, P., ... & Ebens, A. (2006). Expression pattern of the human FcRH/IRTA receptors in normal tissue and in B-chronic lymphocytic leukemia. International immunology, 18(9), 1363-1373.

108. Leu, C. M., Davis, R. S., Gartland, L. A., Fine, W. D., & Cooper, M. D. (2005). FcRH1: an activation coreceptor on human B cells. Blood, 105(3), 1121-1126.
109. Davis, R. S. (2015). FCRL regulation in innate-like B cells. Annals of the New York Academy of Sciences, 1362(1), 110-116.
110. Ehrhardt, G. R., Davis, R. S., Hsu, J. T., Leu, C. M., Ehrhardt, A., & Cooper, M. D. (2003). The inhibitory potential of Fc receptor homolog 4 on memory B cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(23), 13489-13494.
111. Sohn, H. W., Krueger, P. D., Davis, R. S., & Pierce, S. K. (2011). FcRL4 acts as an adaptive to innate molecular switch dampening BCR signaling and enhancing TLR signaling. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 118(24), 6332-6341.
112. Li, F. J., Schreeder, D. M., Li, R., Wu, J., & Davis, R. S. (2013). FCRL 3 promotes TLR 9-induced B-cell activation and suppresses plasma cell differentiation. European journal of immunology, 43(11), 2980-2992.
113. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. methods, 25(4), 402-408.
114. Guièze, R., & Wu, C. J. (2015). Genomic and epigenomic heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 126(4), 445-453.
115. Nabhan, C., Raca, G., & Wang, Y. L. (2015). Predicting prognosis in chronic lymphocytic leukemia in the contemporary era. JAMA oncology, 1(7), 965-974.
116. Kröber, A., Seiler, T., Benner, A., Bullinger, L., Brückle, E., Lichter, P., ... & Stilgenbauer, S. (2002). VH mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 100(4), 1410-1416.
117. Bottoni, A., & A Calin, G. (2013). MicroRNAs as main players in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. Microrna, 2(3), 158-164.
118. Abur, U., Gunes, S., Ascı, R., Altundag, E., Akar, O. S., Ayas, B., ... & Ogur, G. (2019). Chromosomal and Y-chromosome microdeletion analysis in 1,300 infertile males and the fertility outcome of patients with AZFc microdeletions. Andrologia, 51(11), e13402.
119. Hu, B., Patel, K. P., Chen, H. C., Wang, X., Luthra, R., Routbort, M. J., ... & Wierda, W. G. (2019). Association of gene mutations with time-to-first treatment in 384 treatment-naive chronic lymphocytic leukaemia patients. British journal of haematology, 187(3), 307-318.
120. Leeksma, A. C., Baliakas, P., Moysiadis, T., Puiggros, A., Plevova, K., Van der Kevie-Kersemaekers, A. M., ... & Kater, A. P. (2021). Genomic arrays identify high-risk chronic lymphocytic leukemia with genomic complexity: a multicenter study. haematologica, 106(1), 87.
121. Suárez-Cabrera, A., Fiallo-Suárez, D. V., Stuckey, R., Uroz-De la Iglesia, M. L., Florido, Y., Lemes-Castellano, A., ... & Bilbao-Sieyro, C. (2022). Genetic Testing at Diagnosis Has Prognostic Value in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia including at Early Stages. Diagnostics, 12(8), 1802.
122. Lai, Y. Y., & Huang, X. J. (2011). Cytogenetic characteristics of B cell chronic lymphocytic leukemia in 275 Chinese patients by fluorescence in situ hybridization: a multicenter study. Chinese medical journal, 124(16), 2417-2422.
123. Heerema, N. A., Muthusamy, N., Zhao, Q., Ruppert, A. S., Breidenbach, H., Andritsos, L. A., ... & Byrd, J. C. (2021). Prognostic significance of translocations in the presence of mutated IGHV and of cytogenetic complexity at diagnosis of chronic lymphocytic leukemia. haematologica, 106(6), 1608.
124. Özünal, I. E., Elverdi, T., Salihoğlu, A., Eşkazan, A. E., Ar, M. C., Öngören, Ş., ... & Soysal, T. (2021). Kronik Lenfositik Lösemide Genetik Özellikler ve TP53 Mutasyonu. Cerrahpaşa Medical Journal, 45(3), 221-226.
125. Li, F. J., Ding, S., Pan, J., Shakhmatov, M. A., Kashentseva, E., Wu, J., ... & Davis, R. S. (2008). FCRL2 expression predicts IGHV mutation status and clinical progression in chronic lymphocytic leukemia. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 112(1), 179-187.
126. Shea, L. K., Honjo, K., Redden, D. T., Tabengwa, E., Li, R., Li, F. J., ... & Davis, R. S. (2019). Fc receptor-like 2 (FCRL2) is a novel marker of low-risk CLL and refines prognostication based on IGHV mutation status. Blood Cancer Journal, 9(6), 47.
127. Hamblin, T. J., Orchard, J. A., Ibbotson, R. E., Davis, Z., Thomas, P. W., Stevenson, F. K., & Oscier, D. G. (2002). 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, The Journal of the American Society of Hematology, 99(3), 1023-1029.
128. Kazemi, T., Asgarian-Omran, H., Memarian, A., Shabani, M., Sharifian, R. A., Vossough, P., ... & Shokri, F. (2009). Low representation of Fc receptor-like 1–5 molecules in leukemic cells from Iranian patients with acute lymphoblastic leukemia. Cancer immunology, immunotherapy, 58, 989-996.

# EKLER

## EK-1.Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 04.10.2021-66786

"BEKV3P64T"

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Tarihi : 30.09.2021
Toplantı Sayısı : 17
Karar Sayısı : 2

**Konu** : Araştırma Projesi Değerlendirme Raporu (21/91)

Sayın. Doç. Dr. **Ender COŞKUNPINAR**

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunduğunuz 21-91 kayıt numaralı "Kronik Lenfositik Lösemi Hastalarında FCRL Gen Ailesi Ekspresyon Seviyelerinin IgVH Mutasyonu ile Karşılaştırılması ve Prognoza Etkisinin Araştırılması" başlıklı proje önerisi kurulumuzun 30.09.2021 tarihli toplantısında görüşülmüş olup, karar örneği ekte sunulmuştur.

Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK Başkan

Ek: Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu (21-91)

Aslı Gibidir

**e-imzalıdır.**

Prof.Dr.Mustafa ÖZTÜRK
Başkan

Bu belge güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrak doğrulaması https://www.turkiye.gov.tr/sbu-ebys?eD=BSLB3UKEV4&eS=66786 adresinden yapılabilir.

## KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

| | |
|---|---|
| ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI | Kronik Lenfositik Lösemi Hastalarında FCRL Gen Ailesi Ekspresyon Seviyelerinin IgVH Mutasyonu ile Karşılaştırılması ve Prognoza Etkisinin Araştırılması |
| VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU | 21-91 |

| | | |
|---|---|---|
| ETİK KURUL BİLGİLERİ | ETİK KURULUN ADI | SBU Hamidiye Klinik Araştırmalar Etik Kurulu |
| | AÇIK ADRESİ: | SBU Hamidiye Tıp Fakültesi Dekanlığı |
| | TELEFON | - |
| | FAKS | - |
| | E-POSTA | hamidiye.kaek@sbu.edu.tr |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| BAŞVURU BİLGİLERİ | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI | Sayın. Doç. Dr. **Ender COŞKUNPINAR** | | | |
| | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI | Tıbbi Biyoloji | | | |
| | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ | SBÜ Hamidiye Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı | | | |
| | VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI | | | | |
| | DESTEKLEYİCİ | | | | |
| | PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için) | | | | |
| | DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ | | | | |
| | ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ | FAZ 1 | ☐ | | |
| | | FAZ 2 | ☐ | | |
| | | FAZ 3 | ☐ | | |
| | | FAZ 4 | ☐ | | |
| | | Gözlemsel ilaç çalışması | ☐ | | |
| | | Tıbbi cihaz klinik araştırması | ☐ | | |
| | | İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları | ☐ | | |
| | | İlaç dışı klinik araştırma | ☒ | | |
| | | Diğer ise belirtiniz | | | |
| | ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER | TEK MERKEZ ☒ | ÇOK MERKEZLİ ☐ | ULUSAL ☐ | ULUSLARARASI ☐ |

SBU Hamidiye KAEK Başkanı
Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK
İmza:

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

## KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

| | |
|---|---|
| ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI | Kronik Lenfositik Lösemi Hastalarında FCRL Gen Ailesi Ekspresyon Seviyelerinin IgVH Mutasyonu ile Karşılaştırılması ve Prognoza Etkisinin Araştırılması |
| VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU | 21-91 |

| | Belge Adı | Tarihi | Versiyon Numarası | Dili |
|---|---|---|---|---|
| DEĞERLENDİRİLEN BELGELER | ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ | | | Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐ |
| | BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU | | | Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐ |
| | OLGU RAPOR FORMU | | | Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐ |
| | ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ | | | Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐ |

| | Belge Adı | | Açıklama |
|---|---|---|---|
| DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER | SİGORTA | ☐ | |
| | ARAŞTIRMA BÜTÇESİ | ☐ | |
| | BİYOLOGİK MATERYEL TRANSFER FORMU | ☐ | |
| | İLAN | ☐ | |
| | YILLIK BİLDİRİM | ☐ | |
| | SONUÇ RAPORU | ☐ | |
| | GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ | ☐ | |
| | DİĞER: | ☐ | |
| KARAR BİLGİLERİ | **Tarih:30.09.2021** | **Karar No:2021.09.30- 64** | |
| | Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.<br>İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. | | |

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

| Unvanı/Adı/Soyadı | Uzmanlık Alanı | Kurumu | Cinsiyet | | Araştırma ile İlişki | | Katılım * | | İmza |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK | Halk Sağlığı | SBU Hamidiye Tıp Fakültesi | E☐ | K☐ | E☐ | H☐ | E☐ | H☐ | |
| Doç. Dr.Ayşe BATIREL | Enfeksiyon Hastalıkları | SBÜ Kartal SÜAM | E☐ | K☐ | E☐ | H☐ | E☐ | H☐ | |
| Prof. Dr. Mahmut GÜMÜŞ | Tıbbi Onkolog | Medeniyet Üniversitesi | E☐ | K☐ | E☐ | H☐ | E☐ | H☐ | |
| Prof. Dr. E. Turgut IŞITMANGİL | Göğüs Cerrahisi | SBU Abdülhamid Han SUAM | E☐ | K☐ | E☐ | H☐ | E☐ | H☐ | |
| Doç. Dr.Şerhat KÖSEOĞLU | Periodontoloji | SBU Hamidiye Diş Hekimliği Fakültesi | E☐ | K☐ | E☐ | H☐ | E☐ | H☐ | |
| Doç. Dr.Nursel ARICI | Ortodonti | OMÜ Diş Hekimliği Fakültesi | E☐ | K☐ | E☐ | H☐ | E☐ | H☐ | |
| Doç. Dr.Alev | Biyokimya | SBÜ Bakırköy Sadi | E☐ | K☐ | E☐ | H☐ | E☐ | H☐ | |

SBU Hamidiye KAEK Başkanı
Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK
İmza:

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

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

| | |
|---|---|
| ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI | Kronik Lenfositik Lözemi Hastalarında FCRL Gen Ailesi Ekspresyon Seviyelerinin IgVH Mutasyonu ile Karşılaştırılması ve Prognoza Etkisinin Araştırılması |
| VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU | 21-91 |

| KURAL | | Konuk SUAM | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Dr. Öğr. Üyesi Hilal ÖZKAYA | Aile Hekimliği | SBU Haydarpaşa Numune EAH | E☐ | K☐ | E☐ | H☐ | E☐ | H☐ | |
| Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Evren OKUR | Farmakoloji | SBU Hamidiye Eczacılık Fakültesi | E☐ | K☐ | E☐ | H☐ | E☐ | H☐ | |
| Dr. Öğr. Üyesi Süleyman ERSOY | Aile Hekimliği | SBU Ümraniye SÜAM | E☐ | K☐ | E☐ | H☐ | E☐ | H☐ | |
| Mehmet SARI | Sivil Üye/ Hukuk | Özel Sektör | E☐ | K☐ | E☐ | H☐ | E☐ | H☐ | |
| Doç. Dr.Ayşin ERSOY | Anestezi ve Reanimasyon | SBU Abdülhamid Han SUAM | E☐ | K☐ | E☐ | H☐ | E☐ | H☐ | |
| Av. Hilal U. ÖZBEK BALCI | Hukuk | SBU Rektörlük Hukuk Müşavirliği | E☐ | K☐ | E☐ | H☐ | E☐ | H☐ | |
| Prof. Dr. Berna LAÇİN | Fizyoloji | SBU Hamidiye Tıp Fakültesi | E☐ | K☐ | E☐ | H☐ | E☐ | H☐ | |
| Dr. Öğr. Üyesi Merve KABASAKAL | Farmakoloji | SBU Hamidiye Tıp Fakültesi | E☐ | K☐ | E☐ | H☐ | E☐ | H☐ | |

*:Toplantıda Bulunma

SBU Hamidiye KAEK Başkanı
Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK
İmza:

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

**EK-2.Bilgilendirilmiş Onam Formu**

# BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

**I-Araştırmayla İlgili Bilgi Verilmesi:**

**Proje Adı:** Kronik Lenfositik Lösemi Hastalarında FCRL Gen Ailesi Ekspresyon Seviyelerinin IgVH Mutasyonu ile Karşılaştırılması ve Prognoza Etkisinin Araştırılması

**Yapılacak İşlemin Tanımı:** İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji BD.'da Kronik Lenfositik Lösemi tanısı konmuş hastalardan çalışmaya gönüllü olanlara moleküler testler uygulanacaktır.

**Araştırmanın Amacı:** Kronik lenfositik lösemi (KLL), küçük, olgun görünümlü lenfositlerin kan, kemik iliği ve lenfoid dokularda birikimiyle karakterize malign bir hastalıktır. KLL, heterojen klinik seyir göstermekle beraber tanı alan hastaların bir kısmı asemptomatik olup uzun yıllar progresyon olmadan yaşarken, bir kısmı da erken evrelerde bile hızlı progresyon göstermektedir. Bu nedenle günümüzde yüksek riskli hastaları belirlemek için prognostik belirteçler kullanılmaktadır. Bunlar arasında IgVH mutasyon durumu çok büyük öneme sahiptir. IgVH mutasyonu olmayan olguların daha ilerleyici bir hastalık seyrine sahip olduğu, buna karşılık mutasyonlu olguların daha yavaş hastalık seyrine sahip olduğu ve sağ kalımında daha uzun olduğu görülmektedir. Ancak bu tür gen mutasyonlarının saptanması rutin uygulamada mümkün değildir. Bu nedenle IgVH mutasyon durumunu tespit etmede kullanılacak biyobelirteçlere ihtiyaç bulunmaktadır. Bizim de bu çalışmadaki amacımız, Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) bulgularında, IgVH mutasyon durumunun ve KLL'deki diğer prognostik faktörler ile ilişkisinin araştırılması ile hastaların FCRL gen ailesi ekspresyon düzeyleri değerlendirilerek, FCRL gen ailesi üyelerinin KLL hastaları için prognostik öneminin araştırılmasıdır.

**Araştırmada Kullanılacak Yöntemler:** Çalışmaya İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji BD.' da yeni tanı konulan 40-80 yaş arası 60 Kronik Lenfositik Lösemi hastası dahil edilecektir. Çalışmaya girmeyi kabul eden hastalar, gönüllü olur formunu doldurup imzaladıktan sonra İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji BD.' da, rutin yapılan tetkiklerden sonra hastalar, IgVH mutasyonlu ve mutasyonsuz olarak iki gruba ayrılacaktır. Ardından, bu iki gruba kromozomal anomalilerin deteksiyonu ve biyokimyasal parametrelerin analizi gerçekleştirilecektir. Ayrıca hastalardan rutin izlem sırasında 2 ml periferik kan örneği alınacak, soğuk zincirle Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na nakledilecektir ve tam kandan total RNA izolasyonu yapılarak cDNA sentezi gerçekleştirilecektir. İlgili gen

bölgelerine özgü dizayn edilmiş primerlerin uygun prosedürde kullanımı ile ekspresyon analizi yapılacaktır.

**II-Gönüllünün Haklarıyla İlgili Bilgi Verilmesi**

- Bu çalışmada gönüllünün hiçbir hukuki ve mali sorumluluğu bulunmayıp tüm sorumluluk araştırıcı ve destekleyiciye aittir.
- Gönüllü arzusu üzerine mali ve hukuki yükümlülük olmaksızın çalışmadan ayrılabilir.
- Bu işlemler için gönüllüden hiçbir ücret talep edilmeyecektir.
- Bu çalışma için gönüllüye herhangi bir ücret ödenmeyecektir.
- Çalışmaya katılmak zorunluluğunuz bulunmamaktadır, gönüllü istediği takdirde çalışmadan ayrılabilir.
- Gönüllünün çalışmaya katılmayı reddetmesi onun gelecekteki takip ve tedavisi üzerine olumsuz etkide bulunmayacaktır.
- Çalışma kabul kriterlerine ve özelliklerine uyum sağlamadığınız takdirde çalışmadan çıkarılabileceğiniz durumlar oluşabilir. Bu nedenle çalışmadan araştırıcının isteği ile çıkarılabilirsiniz.
- Araştırma sırasında elde edilen test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda araştırmadan isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz.
- Araştırmaya katılmayı kabul etmemeniz durumunda veya herhangi bir nedenle çalışma programından çıkmanız ya da çıkarılmanız halinde hastalığınızın tedavisi ile ilgili hiçbir aksama olmayacaktır.
- Kimlik bilgileriniz gizli tutulacak ve sizden alınacak kandan elde edilecek tüm materyaller özel bir kodlama ile kodlanacak ve bu bilgiler üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.
- Çalışma sonunda elde edilecek verilerle uluslararası çapta yayınlanabilecek, hastalığınıza açıklık getirecek bilgiler elde edilebilmesi mümkündür. Klinik, patolojik ve radyolojik bulgular ve alınan materyaller bundan sonraki bilimsel amaçlı çalışmalarda da kullanılabilecektir. Bu şekilde çalışma sonucunda ulaşılan önemli bir bilgi varsa tarafınıza bildirilecektir.

**Olası riskler ve faydalar:**

**Yapılacak araştırmanın getirebileceği olası riskler:** Size ait genetik bilgi kesinlikle gizli kalacaktır.

İnceleme sonunda elde edilecek sonuçlar istediğiniz takdirde size bildirilecektir. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninize bağlı olacaktır.

**Olası yararlar**: Bu incelemelerin esas amacı hastalığınızın erken dönemde hızlı bir şekilde tanısının konulup yine erken dönemde etkin bir şekilde tedavi edilmesiyle birlikte uzun dönemde gelişebilecek sorunların başvuru anında öngörülmesidir.

**Katılımcının/Hastanın Beyanı:**

Sayın Uzm. Dr. Simge ERDEM tarafından Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD' da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte,

**Dr. Öğr. Üyesi Simge ERDEM'i** …….. no' lu telefondan**,** arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda, gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

**Gönüllünün Adı-Soyadı:** **Tarih:**

**Gönüllünün Telefonu:** **İmzası**

**Adresi:**

**Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no. faks no,)**

**Açıklamaları yapan araştırmacının**

**Adı-Soyadı:** **İmzası**

**Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin**

**Adı-Soyadı:** **İmzası**

**EK-3.Olgu Rapor Formu**

## OLGU RAPOR FORMU (ORF)

| | |
|---|---|
| **HASTA ADI VE SOYADI:** | **ÖRNEK ALINMA TARİHİ:** |
| **TC. KİMLİK NO:** | **HASTA TELEFON NO:** |
| **YAŞ:** | **DR. ADI SOYADI:** |
| **CİNSİYET:** E☐ K☐ | **ÇALIŞTIĞI KURUM:** |
| **BOY VE KİLO:** …….cm, ……kg | |

**HASTALIK TANI TARİHİ:**

**B SEMPTOMU:** **Var:**☐ **Yok:**☐

**AİLESİNDE BİLİNEN BENZER HASTALIK VAR MI?:**

**EŞLİK EDEN HASTALIKLAR:**

**KLL İÇİN ALDIĞI TEDAVİLER:**

**KULLANDIĞI İLAÇLAR:**

**SİGARA KULLANIMI:**

**ALKOL KULLANIMI:**

**FLOW SİTOMETRİK ANALİZLER:**

ZAP-70 seviyesi:

CD 38 seviyesi:

**KEMİK İLİĞİ SİTOGENETİK ANALİZLER:**

**Karyotip Analizi:**

**PERİFERİK KAN FISH İNCELEMESİ:**

del11q22:☐ del17p13:☐ del13q14:☐ Trizomi 12:☐ Diğer: ……..

**KEMİK İLİĞİ İNFİLTRASYON PATERNİ:**

Diffuse:☐ Nodular:☐ Interstitial:☐ Nodular ve Diffuse:☐

**HASTANIN KLİNİK EVRESİ:**

| **Rai Evreleme:** | **Binet Evreleme:** |
|---|---|
| **0:** ☐ | **A:** ☐ |
| **1:** ☐ | **B:** ☐ |
| **2:** ☐ | **C:** ☐ |
| **3:** ☐ | |
| **4:** ☐ | |

**BİYOKİMYASAL TETKİKLER:**

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| B2M | | Kreatinin | | GGT | | **DİĞER** | | **HEMOGRAM** | |
| LDH | | T.Protein | | $Na^+$ | | WBC | | MCV | |
| IgA | | Albumin | | $K^+$ | | HGB | | MCH | |
| IgG | | AST | | $Cl^-$ | | HCT | | MCHC | |
| IgM | | ALT | | Sedim. | | PLT | | Lenfosit | |
| CRP | | ALP | | | | | | Nötrofil | |
| Üre | | Ürik Asit | | | | | | | |

Gönüllülerin 24 saat ulaşabilecekleri araştırıcılar**:**
**Dr. Öğr. Üyesi Simge ERDEM ve Prof. Dr. Ender M. COŞKUNPINAR**