T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

TEDAVİ ALMAMIŞ KRONİK LENFOSİTER LÖSEMİ (*KLL*) HASTALARINDA KALRETİKÜLİN GEN (CALR) MUTASYON SIKLIĞI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Ayşe DAYLAN

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet Ali ÖZCAN

İZMİR 2016

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

TEDAVİ ALMAMIŞ KRONİK LENFOSİTER LÖSEMİ (*KLL*) HASTALARINDA KALRETİKÜLİN GEN (CALR) MUTASYON SIKLIĞI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Ayşe DAYLAN

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet Ali ÖZCAN

İÇİNDEKİLER

SayfaNo

ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ iv
TEŞEKKÜR v
ÖZET 1
ABSTRACT 2
1.GİRİŞ VE AMAÇ 3
2.GENEL BİLGİLER 5
2.1. Kronik Lenfositer Lösemi(KLL) 5
2.1.1. B hücrelerinin gelişimi 5
2.1.2. Tanımlama, prevelans ve etyolojik faktörler 6
2.1.3. Belirti ve bulgular 7
2.1.4. Tanı 8
2.1.5. Evreleme 9
2.1.6 Kronik lenfositik lösemi biyolojisi ve genetiği 11
2.1.7. Prognoz 12
2.1.8. Mutasyonların prognoza etkisi 13
2.1.9. Tedavi 14
2.2. Kalretikülin(CRT) 23
2.2.1. Kalretikülinin yapısı 23
2.2.2. Kalretikülinin görevleri 24
2.2.3. Kanser ile kalretikülin ilişkisi 26
3.MATERYAL VE METOD 29
4.BULGULAR 33
5.TARTIŞMA 37
6.SONUÇ 42
7.KAYNAKLAR 43
EK – 1 56

ŞEKİLLER VE TABLOLAR

Tablo 1: Rai ve Modifiye Rai Evreleme Sistemi

Tablo 2: Binet Evreleme Sistemi

Tablo 3: Primerler

Tablo 4: PCR Protokolleri ve Thermal Cycler Programı

Tablo 5: Pürifikasyon Protokolleri ve Thermal Cycler Programı

Tablo 6: Cycle Sequencing PCR Protokolleri ve Cycle Sequencing Thermal Cycler Programı

Tablo 7: KLL hastalarının klinik özellikleri

Tablo 8: Tanı anındaki laboratuar bulguları

Tablo 9: İkincil kanser dağılımı

Tablo 10: Mutasyon dağılımları

SİMGELER VE KISALTMALAR

BHR : B hücre reseptörü

Bk : Beyaz küre

CAP : Siklofosfamid-adriyamisin-prednizolon

CHOP : Siklofosfamid-adriyamisin-vinkristin-prednizolon

CR : Tam yanıt

Del : Delesyon

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

EBF : Erken B hücre faktörü

EMA : European Medicines Agency

FC : Fludarabin-siklofosfamid

FCR : Fludarabin-siklofosfamid-rituksimab

FDA : U.S. Food and Drug Administration

FISH : Flourescence in Situ Hybridisation

GSK : Genel sağkalım

Hb : Hemoglobin

IGHV : İmmunglobulin ağır zincir değişken bölge

KLL : Kronik lenfositer lösemi

LDH : Laktat dehidrogenaz

LKZ : Lenfosit katlanma zamanı

MKH : Minimal kalıntı hastalık

PLT : Platelet

PR : Kısmi yanıt

PCR : Polimerase chain reaction

PTK : Protein tirozin kinaz

SHZ : Serbest hafif zincir

SKLO : Serbest kappa/lambda hafif zincir oranı

SLL : Küçük lenfositik lenfoma

ZAP-70 : Zeta-chain- associted protein 70

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca bana yardımcı olan ve bilgilerini benimle paylaşan danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Ali Özcan'a, çalışmanın gerçekleşebilmesini sağlayan Uzm. Dr. Berk Özyılmaz'a, deneyimleri ile bana yol gösteren Uzm. Dr. Celal Acar, Uzm. Dr. Doğuş Türkyılmaz ve Uzm. Dr. Aybüke Olgun'a, hayat boyu sürekli beni destekleyen, her şeyi anlamlı ve güzel kılan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ayşe DAYLAN

Nisan 2016

ÖZET

Kronik Lenfositer Lösemi batı ülkelerinde erişkin yaşta görülen en sık lösemi tipi olup olgun B lenfositlerinin malign klon olarak çoğalması sonucu oluşur. Ciddi mortalite ve morbiditeye yol açar. Etyolojisi ve bilinen kesin genetik geçiş net olarak gösterilememiştir. Son yıllarda KLL açısından tanısal, prognostik ve tedaviye yönelik olarak mutasyon analizleri sıklıkla yapılmaktadır. Geçmiş yıllarda tedavi kararını etkilemeyen genetik alt yapı günümüzde tedavi tipini de belirlemektedir.

Kalretikülin hücrede pek çok önemli göreve katılan, asıl olarak ER içinde kalsiyum depolayan ve şaperon görevi gören bir çeşit proteindir. Birçok malignite ile bağlantısı kurulmuş olan bu proteini kodlayan CALR genidir. Miyeloproliferatif hastalıklarda CALR gen mutasyonu bağlantısı gösterilmiştir. Bilinen tüm CALR mutasyonu exon 9 mutasyonu olup delesyon veya insersiyon şeklinde olmaktadır.

Lenfoproliferatif hastalıklar ile kalretikülin ilişkisine yönelik sınırlı çalışma olması nedeni ile çalışmamızda KLL hastalarında CALR mutasyon durumunu saptamayı amaçladık.

Çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Hematoloji Bölümü'nde KLL tanısı ile izlenen ve hastalığına yönelik daha önceden sitotoksik tedavi almamış 39 hasta verisi incelenmiştir. Hastaların CALR mutasyon analizi yapılmıştır. Mutasyon analizi için periferik kandan alınan beyaz kürelerden DNA elde edilmiş, PCR ile çoğaltılan genetik malzemede dizi analizi yöntemi ile exon 9 mutasyonları taranmıştır.

Yapılan analiz sonucunda hiçbir KLL hastasında CALR mutasyonu saptanmamıştır. Hastaların tanı anındaki laboratuar ve klinik bilgilerine dosyalarından ve veri tabanından ulaşılmış olup 21'i (%53,84) erkek, 18'i (%46,16) kadın saptanmıştır. Hastaların tanı anındaki ortanca yaşı 56 bulunmuştur. Tanı anındaki Binet evrelemesine göre 27 hasta (%69,24) evre A, 11 hasta (%28,2) evre B, bir hasta (%2,56) evre C saptanmıştır. Hastaların KLL açısından önemli olan diğer mutasyonları ile ilgili veriler yetersiz olması nedeni ile ileride daha geniş hasta grupları ile daha güvenilir sonuçlara ulaşılabilir.

Anahtar kelimeler: kronik lenfositer lösemi, kalretikülin, CALR mutasyonu

ABSTRACT

Chronic Lymphocytic Leukemia is the most common leukemia of adulthood in western countries which is the disease of clonal malign mature B lymphocytes. Ethyology is uncertain and no genetic mutation is found as the reason for CLL yet. Mutation analysis is performed for diagnostic, prognostic and therapeutical purposes for many years now. Recently mutational status of CLL patients was found to be an important factor for selecting the type of therapy.

Calreticulin is a multifunctional protein which mainly serves as a calcium binder in ER and chaperone for many proteins. Many malignancies are found to be related to calreticulin. CALR gene is coding calreticulin and CALR mutations are commonly detected in myeloproliferative diseases. All CALR mutations are insertion or deletion mutations of exon 9.

There is limited information about the relationship of CRT and lymphoproliferative diseases. The purpose of this study was to analyse CALR mutation status of CLL patients.

The sample of this study consists of 39 CLL diagnosed patients attending to Hematology Department of Dokuz Eylul University who were not treated with cytotoxic agents before. White blood cells were collected from peripheral blood samples, DNA was isolated and copies were multiplied by PCR. Sequence analysis was performed for the exon 9 region. None of the CLL patients had CALR exon 9 mutation. Additional data was collected from patient hospital records. The total number of male patients was 21(53,84%) and female patients was 18(46,16%) respectively. Male vs. Female ratio was 1,16. Most of the patients were Binet stage A (69,24%) and stage B (28,2%) at the time of diagnosis. Only one patient was in Binet C group. Mean age for the time of diagnosis was 56. The data of other important mutations shown to be important for CLL was not enough. New studies with larger patient numbers may be useful for better information.

Key words: Chronic Lymphocytic Leukemia, calreticulin, CALR mutation

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Efektif hematopoez hematopoetik büyüme faktörleri, çeşitli reseptörler ve kemik iliği mikro çevresi arasındaki interaktif ilişki ve fonksiyonlar ile düzenlenmektedir(1). Kök hücrelerden köken alan öncül hücre yapıları miyeloid ve lenfoid öncüller olarak farklılaşmaktadır. Bu işlenme sürecinde yaşanan problemler nedeni ile klon olarak çoğalan hücre gruplarına bağlı olarak hastalıklar oluşabilmektedir.

Kronik Lenfositer Lösemi (KLL) malign monoklonal CD5 pozitif B lenfositlerin çoğalması ve bu hücrelerin kemik iliği, lenfoid organlar ve periferik kanda birikimiyle karakterize erişkin yaşta en sık görülen kronik lösemi tipidir(2). Amerika'da 2008 yılında 15.110 yeni tanı almış KLL hastası ve yaklaşık 90.179 yaşayan KLL hastası bildirilmiştir. Bizim ülkemizde sıklığı ile ilgili istatistiksel resmi bir veri yoktur(1).

İleri yaşlarda ortaya çıkan bu klonal hastalıkta etkilenen populasyon sıklıkla 60 yaş ve üzerindedir. Hastaların %15'i 50 yaşın altındadır(3).

KLL hastalığının nedeni tam olarak bilinmemektedir ve genellikle sporadik olarak ortaya çıkmaktadır. Birinci derece akrabalarda görülen ailesel KLL tanımlanmış ancak etyolojik neden olarak gösterilebilecek gen mutasyonu saptanamamıştır(4).

KLL'nin klinik seyri değişken olmakla birlikte, çoğu hasta belirgin semptom göstermez. KLL' de ortalama yaşam süresi oldukça değişken olup bazı hastalarda 20 yıldan uzun tedavisiz takip süreleri, bazı hastalarda ise hızlı ilerleyici ve agresif semptomlar nedeni ile kemoterapi verilmesi gündeme gelebilir(5,6).Hastalarda birçok faktör göz önüne alınmakla birlikte tedavi kararı özellikle evrelemeye göre verilir.

Hücrelerin klonal KLL oluşturma kapasitelerini hematopoetik kök hücreleri aşamasında kazandıklarına dair bazı bulgular saptanmıştır(7). KLL hücrelerinin büyük bir çoğunluğu G0/G1 hücre dönüşüm fazında kalır(6). Bu nedenle KLL hastalığının sadece B hücrelerinin fazla çoğalmasından değil, ek olarak apoptoz mekanizmasının da bozulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bazı özel mikro RNA genlerinde delesyon olduğu ve B hücrelerinin apoptozdan kaçabildiklerine dair bulgular vardır(5,8).

KLL'nin moleküler sitogenetiği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Genetik çalışmalar sonucu hastaların %80'inden fazlasında kromozom anomalileri tespit edilmiştir. En sık gözlenen genetik değişiklikler sırasıyla delesyon(del)13q14, trizomi 12, del11q22.3, del17p13 ve del13q34'tür. Kromozom anomalilerin hastalığın klinik seyri ile ilişkisi

olabileceği gözlenmişir.

Mutasyon analizlerinin hastalıklar açısından prognostik önemi, tedavi planlanmalarının uygun yapılması açısından faydaları bilinmektedir. Mutasyonların bizzat neden olduğu hastalık durumlarında veya hastalık ile doğrudan olmasa da dolaylı yoldan ilişki kurulması durumunda bu genetik bölgeleri hedefleyen tedavi seçenekleri gündeme gelmektedir. Hedefe yönelik yeni ilaç araştırmaları açısından genetik analizler önemli bir çalışma alanı yaratmaktadır.

Kalretikülin (CRT) sıklıkla endoplazmik retikulumda ve nükleusta bulunan asli görev olarak kalsiyum bağlayan çok işlevli bir proteindir. Bir şaperon olan kalretikülin hücre hayatı ve farklılaşmasında rol oynayan proteinlerin katlanma, oligomerik bağlanma ve kalite kontrolünden sorumludur(9). Son yıllarda CRT'nin şaperon görevinin yanı sıra hücre içinde bir dizi olayda daha görev aldığı keşfedilmiştir. Apoptotik hücre yüzeylerinde CRT ekspresyonu artmakta ve dağılımı değişmekte, bu durum da fagositoz mekanizmasını değiştirmekte ve malign hücrelerin makrofajlar tarafından farkedilmesini kolaylaştırmaktadır(10). Kalretikülin birçok kanser ile ilişkisi ortaya konmuş bir proteindir ve son yıllarda bu proteini kodlayan CALR genindeki mutasyon sıklığının miyeloproliferatif neoplastik hastalıklarda arttığı bildirilmiştir. 2013 yılında yapılan bir araştırmada 311 esansiyel trombositozu olan hastanın 78'inde (%25) ve primer miyelofibroz olan 203 hastanın 72' sinde (%35) kalretikülin mutasyonu saptanmıştır(11).

KLL gelişiminde CALR mutasyonunun rolü olup olmadığı konusunda yapılmış yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan lenfoproliferatif hastalıklar ile CALR ilişkisinin olup olmadığı konusunda araştırmalar yapılması gerektiği öngörülmektedir.

CALR mutasyonu ile KLL arasında belirgin bir ilişki kurulması durumunda tanı, tedavi, prognoz, yeni tedavi ve takip stratejileri geliştirilmesi konularında daha ileri adımlar atılabilir. Çalışmamızda hastalığına yönelik tedavi almamış KLL hastalarında CALR mutasyonu olup olmadığı varsa sıklığını saptamayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KRONİK LENFOSİTER LÖSEMİ

2.1.1. B hücrelerinin gelişimi

Efektif hematopoez hematopoetik büyüme faktörleri, çeşitli reseptörler ve kemik iliği mikro çevresi arasındaki interaktif ilişki ve fonksiyonlar ile düzenlenmektedir(1). Kök hücrelerden köken alan öncül hücre yapıları öncelikle miyeloid ve lenfoid öncüller olarak farklılaşmaktadır. Daha sonrasında ortaya çıkan hücrelerin farklılaşması daha rafine hale gelir ve bölünmeler sonunda tek bir hücre tipi ile oluşur. Lenfopoez sürecinin düzenlenmesi hem lenfosit öncülleri hem de olgun lenfositler düzeyinde gerçekleştiği için miyelopoezden daha karmaşıktır.

İnterlökin 7 reseptörüne sahip ortak lenfoid öncüller olarak bilinen multipotent kök hücre grubu; lenfoid, miyeloid/megakaryosit/eritroid ayrımından sonraki lenfoid seri gelişimde ilk basamak olarak düşünülmektedir(12). Lenfoid öncüller daha sonra T ya da B lenfositlere dönüşürler. Lenfoid öncüllerin oluşmasından sonra B hücrelerin özelleşmesi için EBF (erken B hücre faktörü), E2A ve PAX 5 transkripsiyon faktörleri işlev görür(13).

Kemik iliğinde başlayan öncül hücrelerden B hücresine farklılaşma süreci sırasında yeniden düzenlemeler ile immunglobulin(Ig) ağır zincir geni ve sonra da kappa ve lambda hafif zincir geni etkilenir, ve bu da uyarılmamış B lenfositlerinin yüzeyinde Ig M ve Ig D ekspresyonuna yol açar.

B lenfostlerinin olgunlaşması sadece kemik iliği ile sınırlı kalmaz ve periferik lenfoid dokularda da devam eder(14). Olgunlaşmamış B lenfositleri kemik iliğinden kana katılır ve lenf nodlarına yerleşirler. Uygun antijenle karşılaştıklarında bu hücrelerden bazıları çoğalmaya başlar ve doğrudan Ig M salgılayan plazma hücrelerine veya bellek B hücrelerine dönüşür. Çoğu uyarılmış B hücresi ise lenfoid foliküllerin germinal merkezlerine yönlenirler. Burada sentroblast adını alırlar, hızla bölünürler ve değişken gen bölgelerinde somatik hipermutasyon gerçekleşir. Sentroblastlar daha sonra artmış antijen bağlama ve yüksek afiniteli antikor üretme kapasiteleri olan sentrositlere dönüşürler. Bu hücreler başka immunoglobulinleri de eksprese edebilen sınıf değiştirme ‘class switching’ sürecine girer. Sonrasında uzun ömürlü bellek veya plazma hücrelerine dönüşürler. Yeniden antijenle uyarıldıklarında, uyarıya çoğalma ya da immunglobulin sentezi ile cevap verirler.

Normal bir immunglobulin veya antikor iki ağır zincir ve iki hafif zincirden oluşur. B hücre reseptörü(BHR) membrana bağlı immunglobulin ve CD79A/CD79B heterodimeri içerir. BHR sekonder lenfoid organ olan lenf bezlerinde antijen ile karşılaşmada işlev görür ve her antijene özgül ayrı bir BHR bulunur. Her B hücresi özgün bir çeşit BHR üretmesi nedeni ile B hücre malignitelerinde moleküler bir belirteç olarak kullanılabilir(15).

2.1.2. Tanımlama, prevelans ve etyolojik faktörler

Dünya Sağlık Örgütü(DSÖ) tarafından hematolojik malignitelerin sınıflandırılmasında malign hücrelerin ait oldugu dizi ve köken oluşturduğu varsayılan hücreler göz önüne alınmaktadır.

KLL olgun görünümlü neoplastik B hücrelerinin periferik kan, lenf bezleri, kemik iliği, karaciğer, dalak gibi organlarda artışı ile karakterize bir hastalıktır.

KLL bir çeşit lösemik lenfositik lenfoma olarak tanımlanmakta olup DSÖ tarafından her zaman neoplastik bir B hücre hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Eskiden T-KLL olarak adlandırılan hastalık günümüzde T-hücreli prolenfositik lösemi olarak adlandırılır.

Kronik lenfositer lösemi olgun, uzun ömürlü B lenfositlerin klonal olarak çoğalmasıyla giden bir çeşit lenfoproliferatif hastalıktır. Kronik lenfositer lösemi ve küçük lenfositik lenfoma (SLL) aynı patolojik hücre grubundan köken almakla birlikte klinik olarak lösemik ya da nodal öğelerin baskın olmasıyla birbirlerinden ayrılırlar. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2001 yılındaki sınıflamasında aynı kategoride ele alınmışlardır(14) SLL ve KLL'nin aynı yaklaşımla tedavi edilmesi önerilmektedir(16).

KLL batı ülkelerinde erişkinlerde görülen en sık lösemi olup insidansi 4.2/100000/ yıldır(17). KLL görülme insidansı yaşla orantılı olarak artmaktadır(18,19). Yaşı 70 'in üzerinde olan bireylerde hastalığın insidansı 50/100000/yıla çıkmaktadır(1). Hematolojik maligniteler içerisinde ileri yaş hastalığı olarak bilinir. Tanı anında ortanca yaş 67-72 civarındadır(20,21,22). Ancak son zamanlarda genç yaşta ve erken evrede tanı alan hastaların oranı artmakta bu durum hastaneye ulaşan kişilerin artışı ve herhangi bir nedenle tetkik edilen hastaların tam kan sayımının sık kontrol edilmesi ile açıklanmaktadır(23). Erkeklerde

kadınlara oranla daha sık görülür(20,24,25).

Etyolojisi net olmayan ve tanımlanmış kesin bir mutasyon gösterilememiş olan KLL çoğunlukla sporadiktir. KLL'de ailesel yatkınlık gösterilmiş olup bununla ilgili yapılan çalışmalarda KLL hastalarının birinci derece yakınlarında herhangi bir lenfoproliferatif hastalık görülme sıklığının 2,5 kat arttığı ve KLL hastalarının %6'sının akrabalarında da KLL olduğu gösterilmiştir(26,27,28). Diğer hematolojik hastalıklarda radyasyon veya benzen maruziyetinin rolü olmakla birlikte KLL için bu ilişki kurulamamıştır. Tarım işçilerinde artmış herbisid kullanımı ile KLL insidansında artış gösterilmiştir(29).

2.1.3. Belirti ve bulgular

KLL'de erken evre hastalarda herhangi bir belirti olmayabilir. Sıklıkla hastaların rutin kontrol veya başka sebepler nedeni ile alınan tam kan sayımlarında beyaz küre(BK) yüksekliği nedeni ile araştırılırken periferik kan yaymasında olgun lenfositlerin görülmesi ile ön tanı konur.

Tanı sırasında asemptomatik olan hastaların izlemde semptomlar ortaya çıkabilir. Semptomatik olan hastalarda kilo kaybı, iştahsızlık, gece terlemesi ve yorgunluk olabilir. Hastaların bir kısmı boyunda, aksiller bölgede veya inguinal lenf bezlerinde büyüme fark ederek hekime başvurur. Dalak ve karaciğerde büyüme olduğunda dolgunluk hissi veya ağrıdan şikayetçi olurlar.

Fazla sayıda olmalarına rağmen malign olan lenfositler normal lenfositlerin aksine enfeksiyonla mücadele etme yeteneğini kaybetmişlerdir. Bu nedenle enfeksiyonlara yatkınlık görülebilir.

Kemik iliği tutulumu nedenli sitopeniler gelişebilir. İlerleyen evrelerde anemiye bağlı halsizlik, solukluk, çabuk yorulma, çarpıntı görülebilir. Trombosit sayısının belli değerlerin altına düşmesi durumunda peteşi ve purpuralar, spontan oluşan ekimozlar, diş eti kanamaları görülebilir. Ciddi trombositopenilerde gastrointestinal kanamalar, hemorojik serebral olay gibi hayati durumlar söz konusu olabilir.

KLL hastalarında otoimmun sitopeniler, hipogamaglobulinemi ile ilişkili enfeksiyonlar, hastalığın hızlı seyirli lenfoproliferatif hastalıklara dönüşümü ve artmış ikincil kanser sıklığı görülebilir (31).

2.1.4. Tanı

KLL tanısı için kandaki monoklonal B lenfosit sayısının en az 3 ay boyunca $5x10^9$/L (5000/μL) veya üzerinde olması gerekir. Akım sitometri ile bu hücrelerin immunofenotipinin klonal hücrelerden oluşan KLL ile uyumlu olduğunun gösterilmesi tanıda gereklidir. Kesin tanı koymak için kemik iliği biyopsisi veya lenf nodu biyopsisi alınması şart değildir. KLL ile açıklanamayacak sitopenilerde kemik iliği biyopsisi, hızlı tümör büyümesi ve klinik ağırlaşma olması durumunda Richter transformasyonu açısından lenf bezi biyopsisi alınabilir. Difüz büyük B hücreli lenfomaya (DBBHL) dönüşüm Richter transformasyonu olarak adlandırılır ve genellikle kötü prognoz gösterir(32).

Periferik kanda $5x10^9$/L'den daha az klonal B lenfosit bulunan ve organomegali ya da lenf bezinde büyüme gibi klinik semptomları ya da sitopenisi olmayan hastalar monoklonal B lenfositoz olarak adlandırılır. Bu olgular yıllık %1-2 oranında tedavi gerektiren KLL'ye dönüşme ihtimali taşır(33).

DSÖ sınıflamasında SLL ve KLL aynı durum olarak ele alınmıştır. SLL tanısı lenfadenopati veya organomegali (karaciğer veya dalakta büyüme) ile birlikte kanda en az 3 ay boyunca $5x10^9$/L'den daha az monoklonal B lenfosit bulunması olarak tanımlanmıştır. Kemik iliğinin klonal olarak infiltre edilmesi nedeni ile sitopeni SLL'de olmamalıdır. KLL hastalığının aksine SLL'de lenf nodu biyopsisi mümkün oldukça önerilir(32).

Tanı koyarken periferik kan yayması yol göstericidir. KLL hücreleri küçük, dar sitoplazmalı, yoğun çekirdek yapısına sahip ve çekirdekçiğin yer yer toplanmış kromatin içerdiği olgun lenfositlerdir. Bu hücrelerin yanında daha büyük atipik hücreler veya promiyelositler de bulunabilir. Ancak genellikle bu hücreler küçük bir oranda bulunurlar. Atipik hücrelerin sayısı %55'i geçerse bu hastalar promiyelositik lösemi olarak adlandırılır. Bu hastalık KLL'den ayrı olarak değerlendirilir.

İmmunfenotiplendirme diğer lenfomalardan KLL ayrımını sağlamaktadır. Tanısal açıdan ve klonaliteyi göstermesi açısından immunfenotiplendirme yapılması önerilir. KLL hücreleri bir T hücre antijeni olan CD5 ile birlikte B hücre reseptörleri (CD19, CD23) taşırlar. CD20, CD79b ve FMC 7 antijenlerini çok az taşır ya da hiç taşımazlar(34,35). CD19 pozitif olabilecek hastalıklardan olan folliküler lenfoma, tüylü hücreli lenfoma ve marginal zon lenfomadan CD5 pozitifliği ile ayrılabilir. CD19 ve CD5 birlikte taşıyan mantle cell lenfoma ise KLL'nin aksine çoğunlukla CD23 taşımaz. Diğer yandan B hücreli prolenfositik lösemi olgularının yarısında CD5 bulunmaz ancak yüksek CD20 ve yüzey Ig taşırlar(35).

KLL lenfositleri normal B hücrelerine göre daha az yüzey immunoglobulinleri, CD20 ve CD79b eksprese ederler(34,36). Her klon kappa ya da lambda hafif zincirlerinden birini üretir(34).

2.1.5. Evreleme

KLL tanısı alan hastalarda prognostik açıdan, tedavi veya izlem kararının değerlendirilmesinde kullanmak üzere farklı alt gruplar belirlenmeye çalışılmıştır. Yaygın olarak kullanılan iki farklı evreleme sistemi vardır. Bunlar Rai sistemi ve Binet sistemi olarak adlandırılır.

Orijinal Rai sistemi 5 gruptan oluşmakta idi(37). İlerleyen yıllarda modifiye Rai sistemi ile 3 ayrı prognostik grup belirlenmiştir(32). Evrelemede organomegali, anemi ve trombositopeni olup olmamasına göre gruplar belirlenir.

Modifiye Rai evrelemesinde düşük riskli hastalık grubu eskiden Rai 0 olarak adlandırılmaktaydı. Bu evrede kanda monoklonal lenfositoz ve/veya lenfoid hücrelerin kemik iliğinde %30'dan fazla bulunması gerekir.

Eski adı ile Rai 1-2 olan orta riskli evre, lenfositoz ile birlikte herhangi bir lenf bölgesinde büyümüş bezeler ve/veya organomegali bulunması durumudur.

Yüksek riskli evrede ise hastalık ilişkili Hemoglobin(Hb) düşüklüğü (Hb<11g/dL) veya trombositopeni (PLT $<100x10^9$/L) vardır. Eski sınıflamaya göre Rai 3 ve Rai 4 gruplarını içerir.

Binet evreleme sistemi normalden büyük lenf nodu içeren bölge sayısı, organomegali,

anemi ve trombositopeni varlığını temel alır(38).

Evrelemede dikkate alınan lenf bölgeleri şunlardır:

- Baş boyun bölgesi, Waldeyer halkası dahil olmak üzere
- Aksilla bölgesi(iki tarafta birden büyüme olması durumunda tek bölge kabul edilir)
- İnguinal bölge(yüzeyel femoral bölge dahil, iki tarafta birden büyüme olması durumunda tek bölge kabul edilir)
- Palpe edilen dalak
- Palpe edilen karaciğer

Evre A: Hb 10 g/dL üzerinde ve trombosit 100×10^9/L üzerinde ve en çok iki lenf bezi alanında tutulum olması

Evre B: Hb 10 g/dL üzerinde ve trombosit 100×10^9/L üzerine ve organomegali veya üç ve üçten fazla lenf bezi bölgesinde tutulum olması

Evre C: Organomegali olsun ya da olmasın Hb 10g/dL altında ve/veya trombosit 100×10^9/L'den az olması

Her iki evreleme sistemi de basit, ucuz ve hekimler tarafından kolay uygulanabilir ve tüm dünyada yaygın olarak kullanılabilir özelliktedir. Temel olarak tam kan sayımı ve fizik muayeneye dayalı olan bu sistemlerde bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans ya da ultrason gibi görüntüleme tetkiklerine ihtiyaç duyulmaz.

Tablo 1: Rai ve Modifiye Rai Evreleme Sistemi(32,37)

Modifiye Rai	Rai Evre	Bulgular
Düşük risk	0	Lenfositoz (>5000 lenfosit/μL) ya da kemik iliğinde>%30 lenfoid hücre
Orta risk	I-II	Lenfadenomegali Hepatomegali ve/veya splenomegali
Yüksek risk	III-IV	Anemi(Hb<11g/dL veya Trombositopeni(<100×10^9/L)

Tablo 2: Binet Evreleme Sistemi(38)

Binet Evre	Bulgular
A	Hb ≥ 10g/dL, PLT≥100x10^9/L, en fazla 2 bölge tutulumu
B	Hb≥10g/dL, PLT≥100x10^9/L, ≥3 bölge tutulumu
C	Hb<10g/dL, PLT<100x10^9/L

2.1.6. Kronik lenfositik lösemi biyolojisi ve genetiği

KLL hücrelerinin öncül hücrelerden olgun B lenfositlere dönüşmesi sürecinin hangi basamağından ortaya çıktığı ve tam olarak hangi hücreden köken aldığı net aydınlatılamamıştır. Ancak bu hücrelerin bellek B hücreleri olduğu düşünülmektedir.

KLL hastaları Ig ağır zincir mutasyonu olanlar ve olmayanlar olarak iki grupta incelendiğinde, farklı hastalarda benzer B hücre reseptörü oluşmuş olması, otoantijen ya da etyolojide rol oynayan enfeksiyon etkenleriyle ilişkili antijenlerin varlığını gündeme getirmiştir(39,40). Ancak KLL etyolojisinde kanıtlanmış bir enfeksiyon etkenine ait antijen gösterilememiştir (41,42)

KLL hastalarında B hücre reseptörünün antijenden bağımsız, ağır zincir tamamlayıcılık belirleyici bölgesi (HCDR3) ilişkili olarak otonom bir şekilde sinyal gönderdiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır(43). BHR'nin uyarılmasıyla aktive olan protein tirozin kinazların (PTK) aşırı üretimi antiapoptotik etki göstermektedir. KLL'de Bak ve Bax gibi apoptotik proteinlerin üretimi azalmış ve Bcl-2 ve Bcl-XL gibi antiapoptotik proteinler artmıştır(44). Bu durum KLL patolojisinde apoptoz sisteminde bozulmanın önemli olduğunu düşündürür. Ancak tek sorun apoptoza giden hücre sayısının azalması değildir. Bunun yanında hücre aşırı çoğalmasının da devam etmekte olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda döteryumun yeni çoğalan hücrelerin DNA'sına bağlanması ölçülmüş ve KLL hücrelerinin düşük ama ölçülebilir bir çoğalma hızı olduğu gösterilmiştir(45). Bu yavaş çoğalma nedeni ile KLL hastalarında yapılan sitogenetik çalışmalarda alışılmış mitojenler ile hücre artışı çok yavaş sağlanabilmekte bu nedenle araştırmacılar floasan in situ hibridizasyon(FISH) tekniği ile çalışmaktadır.

2.1.7. Prognoz

KLL hastalarında yaşam süresi hastadan hastaya değişmektedir. Bazı hastalarda uzun süreli sağkalım ve hatta nadiren spontan remisyon görülürken bazılarında ölümle sonuçlanabilecek hızlı bir ilerleyiş olabilir. Genellikle çok agresif olmayan bu hastalıkta tedavi endikasyonu oluşması aşamasına gelindiğinde ortaya çıkan komplikasyonlar mortalite ve morbiditelere yol açmaktadır.

Prognoz ile ilgili kullanılan birincil ölçek hastalığın evresidir. Binet A ve modifiye Rai düşük risk grubu hastalar için ortanca genel sağkalım 10 yılın üzerinde iken, Binet B ve modifiye Rai orta risk grubu hastalar için 5-7 yıl, Binet C ve modifiye Rai yüksek risk grubu hastalar için 1-3 yıl olarak bulunmuştur(46). Ancak özellikle erken evrede bu prognostik parametrelerin bireysel prognozu belirlemede yetersiz kaldığı dikkati çekmektedir.

Beklendiği gibi kötü performans durumu kötü prognozla ilişkilidir. İleri yaş ve erkek cinsiyet ile kötü prognoz arasında ilişki bulunmuştur(47). Tanı anındaki lenfosit sayısının yüksek olması mortalite ile bağlantılı bulunmuştur(48).

Lenfosit sayısının iki katına çıkma süresi lenfosit katlanma zamanı(LKZ) olarak adlandırılır. LKZ, lenfosit sayısı, kemik iliği infiltrasyon durumu, B2- mikroglobulin ve laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyi tümör yükünü gösterir. Tedavi alan hastalarda yüksek B2-mikroglobulin düzeyi, tedaviye yanıtsızlık ve genel sağkalımda kısalma ile ilişkili bulunmuştur. Bu belirteçler genellikle klinik evreleme sistemleriyle uyum göstermektedirler. Tedavi verilen hastalarda tedaviye yanıt ve tedavi sonrasında bakılan minimal kalıcı hastalık (MKH) progresyonsuz yaşam süresi ya da toplam sağkalım yönünden anlamlı bulunmuştur(49).

DNA sentez basamağında yer alan timidin kinazın yüksek düzeyde olması ilerleyici hastalığı gösterir. Yine ilerleyici hastalık ile çözülmüş CD23'ün fazla miktarda bulunması arasında ilişki ortaya konmuştur(50).

Son yıllarda anormal serbest kappa/lambda hafif zincir oranı (SKLO) ve serbest hafif zincir (SHZ) yüksekliğinin erken tedavi ihtiyacı ve kısa sağkalımla ilişkisini gösteren çalışmalar yapılmıştır(51,52).

2.1.8. Mutasyonların prognoza etkisi

KLL'de en sık görülen genetik mutasyonlar 13q, 11q ve 17p delesyonları ve trizomi 12'dir(53,54). Bazı mutasyonlar iyi bazıları ise kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir.

KLL'de en sık görülen 13q14 delesyonu (%40-60) tek başına olduğunda iyi prognozu gösterir(55). Bu bölgelerde ilgili genler net belirlenememiştir Ancak 13q kolunda iki mikro RNA geni (miR-15a, miR-16-1) KLL hastalarında azalmış veya tamamen silinmiş olması nedeni ile dikkatleri çekmiştir(8). Mir15/16 normalde antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi negatif yönde etkileyerek apoptozu destekler. KLL hastalarında Bcl-2 genellikle artmıştır(56). Yapılan hayvan deneylerinde miR15a/16-1 lokusunda delesyon ile birlikte DLEU geninde delesyon olan hayvanlarda KLL lökemogenezisine benzer sonuçlara ulaşılmıştır(57).

Tümör baskılayıcı gen TP53 17. kromozomun p kolunda yer alır. Del17p olan hastaların çoğunda(%80) TP53 allelinde mutasyon bulunmaktadır(58). Del17p olan veya TP53 genindeki mutasyon (hastaların %5-10'u) tedaviye direnç ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiş, bu hastalarda genel sağkalım ortancası 2-3 yıl saptanmıştır(59). Relaps ve refrakter KLL hastalarında 17pdel/TP53 mutasyon sıklığı artmıştır(60). Bu hastalarda genotoksik tedavilere direnç ve anti CD20 antikorları eklenmesine rağmen ilerleyici hastalık görülür(61). 17p delesyonu olmadan sadece TP53 mutasyonu olan KLL hastaları da benzer şekilde kötü seyreder(58).

Kötü bir diğer prognostik mutasyon 11q delesyonudur ve hastaların yaklaşık %15-20'sinde saptanır(53,62). ATM(ataxia telengiectasia mutated) geni 11q22 bölgesinde bulunur. Bu gen DNA hasarı olduğunda p53 proteinini artırır ve kararlı hale getirir. 11q22-23 delesyonu bulky lenfadenopatiler, hızlı ilerleyici hastalık, erken tedavi ihtiyacı, kısa genel sağkalımla ilişkilidir(62,63).

Trizomi 12 (yaklaşık %15) olan vakalarda toplam sağkalım FISH negatif olanlara göre daha kısa bulunmuştur. Ancak bu konuda yapılan araştırmalar sonrasında prognoza etkinliği konusunda uzlaşıya varılamamıştır(53,58).

Prognostik önemli bir belirteç de B hücre reseptör ağır zincir segmenti(IGHV) mutasyon durumudur. KLL hastalarının %50'sinde görülen, mutasyona uğramamış IGHV'nin orjinal genle en az %98 benzerlik göstermesi kötü prognoz göstergesidir. IGHV geninde

polimorfizm olması nedeni ile mutasyon olduğunun göstergesi olarak %98'lik benzerlik sınırı konmuştur. IGHV mutasyonunun genel sağkalım, tedavisiz izlem süresi, tedavi yanıtı ve yanıt süresine etkisi gösterilmiştir. Bir çalışmada ortanca genel sağkalım mutasyona uğramış grupta 24 yıl iken mutasyona uğramamış grupta 9 yıl bulunmuştur(64). IGHV mutasyon durumu ile CD38 ve ZAP-70 arasında dolaylı bir ilişki olup çalışılan laboratuarın referans değerine göre akım sitometri ile %20-%30 sınırının üzerinde CD38 ekspresyonu kısa tedavisiz izlem süresi, kötü tedavi yanıtı, kısa ilerlemesiz sağkalım ve genel sağkalımla ilişkili bulunmuştur(65,66)

T hücrelerinde hücre içi sinyal yollarında görev alan bir tirozin kinaz olan ZAP-70 ekspresyonu arttığında daha kısa tedavisiz izlem ve kısa sağkalım süresi olduğu gösterilmiştir(67).

Tüm exom sekanslama ile tüm bu genetik mutasyonlarla paralel olarak NOTCH1, MYD88, TP53, ATM, SF3B1, FBX7, POT1, CHD2 ve BIRC genleri ile KLL arasında bağlantı kurulmuştur. Bu genlerin çoğu genetik tamir ile ilişkilidir ve apoptozu etkilerler. Bu genlerdeki değişiklikler kötü prognoz ve fludarabin tedavisine direnç ile ilişkilendirilmiştir(68).

2.1.9. Tedavi

Hastalığın tüm hastalarda tamamen başarı sağlayan bir tedavisi henüz bulunamamıştır ve yeni ilaç tedavileri araştırılmaktadır. Hastaların tedaviye başlama endikasyonları herhangi bir çalışmada katılımcı olup olmamalarına göre değişmektedir. Genel yaklaşımda yeni tanı almış Rai evre 0 ya da Binet A sınıfında olan asemptomatik hastalarda hastalığın ilerlediğini gösteren bulgu olmaması durumunda klinik takip önerilmektedir. Bu hastalarda 3-12 ay aralıklarla kan hücre sayımlarının ve fizik bakı yapılması önerilmektedir.(31).

Daha önceden yapılmış araştırmalar sonucunda erken evre hastalarda alkilleyici ajan kullanımın toplam sağkalım üzerine ek katkı sağlamadığı görülmüş ve yapılan meta analizlere de teyit edilmiştir(69). Hatta bir çalışmaya göre erken evre hastalarda tedavi verildiğinde ölümcül epitelyal kanser sıklığında artış saptanmıştır(70).

Hastalığın ilerlediğini gösteren bu bulgular şunlardır:

- İlerleyici kemik iliği yetmezlik bulguları (anemi ve/veya trombositopeni)
- Masif veya ilerleyici veya semptomatik splenomegali (sol kostal sınır altından

≥6 cm aşağıda)

- Masif lenf nodları (>10 cm uzunlukta) veya ilerleyici veya semptomatik lenf nodları
- 2 aylık zaman diliminde lenfosit sayısının %50'den fazla artışı
- 6 aylık süreden kısa zamanda lenfosit katlanma zamanına ulaşılması
- Kortikosteroide veya standart tedavilere zayıf cevap veren otoimmun anemi ve/veya trombositopeni
- Hastalık ilişkili semptomlar (son 6 ayda kilonun %10'undan fazlasının istemsiz kaybı, belirgin yorgunluk, iki hafta ya da daha uzun süren kanıtlanmış enfeksiyonun olmadığı 38 dereceyi geçen ateş, 1 aydan fazla süredir olan gece terlemeleri)

Modifiye Rai'ye göre orta ya da yüksek riskli hastalar yani Binet B veya C grubunda olan hastalar genellikle tedaviden fayda görmektedir. Orta Riskli KLL'de olguların hastalığın ilerlediği veya aktifleştiği gösterilene kadar tedavisiz izlemde tutulabileceği de söylenmektedir(36).

Tedavi kararını vermeden önce lenfositozu tetikleyebilecek enfeksiyon gibi faktörlerin dışlanması gerekir. KLL hastalarında lökosit birikimi ve çökelti oluşturmasına bağlı komplikasyonlar nadirdir. Bu nedenle tek başına lenfosit sayısının yüksekliği tedaviye başlama endikasyonu oluşturmaz(18). Prognoza etkisi olduğu gösterilmiş genetik değişikliklerin, tedavi endikasyonunda kullanılabileceğine dair oluşmuş belli bir uzlaşı yoktur. Del17p veya TP53 mutasyonu varlığı aktif hastalık bulgusu olmayan olgularda tedavi endikasyonu oluşturmaz.

2015 KLL teşhis, risk değerlendirme ve tedavi önerilerinde tedavi verilecek olan ileri evrede, semptomatik hastalarda öncelikli olarak kümülatif hastalık skorlamasının dikkate alınması gerektiği belirtilmektedir(18).

Uluslararası KLL çalışma grubu tarafından 2008 yılında tedavi cevaplarının sınıflandırılması için bazı tanımlamalar belirtilmiştir(36).

Tam remisyon(CR): Tedavi bitiminden en az 2 ay sonra hasta değerlendirilmeli ve aşağıdaki ölçütlerin tümü karşılanmalıdır.

- Kandaki lenfosit sayısı <4000 ve kemik iliğinde lenfoid hücreler ≤30%
- Palpe edilen lenf nodu olmamalı(1.5 cm ve altında olmalı)
- Splenomegali ya da hepatomegali olmamalı
- Konstitüsyonel semptomlar olmamalı(kilo kaybı, ateş, gece terlemesi, anlamlı halsizlik)
- Kan sayımında büyüme faktörü kullanılmaksızın nötrofil $>1.5x10^9$, Hb >11g/dL, trombosit $>100x10^9$/L
- Klinik çalışmada yer alanların son tedaviden sonra 2. ayda kemik iliği aspirasyon ve biyopsisinin yapılması gerekir.

Kısmi remisyon(PR): Aşağıdakilen en az ikisi olmalı ve en az 2 ay sürmeli ayrıca konstitüsyonel semptomların 1 veya daha uzun sürmesi kayıt edilmelidir.

- Çevresel kan lenfosit sayısının başlangıç değere göre %50 veya daha fazla azalması
- Etkilenen lenfadenomegalilerin boyutunun toplamının %50 ve üzerinde gerilemesi
- Etkilenen hepatomegali veya splenomegali boyutunun %50 ve üzerinde gerilemesi
- Kan sayımında büyüme faktörü kullanılmaksızın nötrofil $>1.5x10^9$ /L, transfüzyon veya büyüme faktörü ihtiyacı duyulmadan Hb >10g/dL veya bazal düzeye göre %50 artış olması, büyüme faktörü kullanılmaksızın trombosit $>100x10^9$ /L veya bazal düzeye göre %50 artış olması

İlerleyici hastalık: Aşağıdakilerin herhangi birinin varlığı yeterlidir.

- Lenfosit sayısının başlangıca göre %50 ve üzerinde artması
- Lenf düğümü boyutlarının başlangıç değere göre %50 ve üzerinde artması
- Hepatomegali veya splenomegalinin yeni ortaya çıkması ya da boyutlarının %50 ve üzerinde artması
- Yeni lezyon varlığı
- Daha agresif histolojiye dönüşüm(Richter transformasyonu)

- KLL'ye atfedilen sitopeni ortaya çıkması
- Tedaviden 3 ay sonrası kemik iliği biyopsisi KLL infiltrasyonunu görülmesi ve sitopeninin ortaya çıkması

Stabil hastalık: Tam ya da kısmi remisyona girmeyen ve ilerleyici özellikte de olmayan hastalar bu gruba alınır ve yanıtsız olarak değerlendirilirler.

İlerlemesiz sağkalım: Çalışmaya girme ile hastalığın progresyonu veya ölüme kadar olan süredir.

Genel sağkalım: Çalışmaya girme ile herhangi bir sebepten olan ölüme kadar geçen süredir.

Relaps: Tam ya da kısmi yanıt gösteren ancak aradan 6 ayı geçen süre sonrasında hastalığın ilerlediği durumdur.

Refrakter hastalık: Tedavi başarısızlığı veya 6 aydan kısa sürede hastalığın ilerlemesidir.

Minimal kalıcı hastalık(MKH): Günlük uygulamada MKH bakılması önerilmezken son yıllarda tedavi çalışmalarına alınan hastalarda önemli duruma gelmiştir. Son yıllarda dört renk akım sitometri ya da allele özel oligonükleotid polimeraz zincir reaksiyonu ile klinik araştırmalarda MKH ölçülmesi önerilmektedir(71). Alemtuzumab konsolidasyon tedavisi sonrasında ölçülebilir MKH relaps ve kısa progresyonsuz sağ kalımla ilgili bulunmuştur(49,72).

KLL'de tedavi seçenekleri:

Tek ajan kullanılanlar

Sitotoksik ajanlar:

Onlarca yıldır klorambusil kullanımı KLL tedavisinde ilk sıra verilecek altın standart ilaç olarak kabul edilmişti. Günümüzde hala yaşlı ve düşkün hastalarda önerilmektedir(18). Anti CD20 antikorları ile kombine edildiğinde daha etkin olması nedeni ile güncel yaklaşımda tek başına klorambusil nadiren kullanılır. Düşük toksik etkisi, ucuz olması ve ağızdan

kullanılabilir olması nedeni ile tercih sebebidir. Ancak tam remisyon oranının düşük olması, uzun süreli kullanımlarda uzamış sitopeni, miyelodisplazi, sekonder akut lösemi gibi yan etkiler nedeni ile yaygın kullanılmaz.

Fludarabin, pentostatin, ve kladribin KLL tedavisinde kullanılabilen pürin analoglarıdır. Fludarabin konvansiyonel alkilleyici ve steroid içeren tedavilere (CHOP, CAP veya klorambusil) göre daha fazla remisyon sağlamış ancak tek ajan olarak kullanıldığında genel sağkalımı artırmamıştır(73,74).

Kladribin monoterapisi ile klorambusil ve prednizon birlikte verilen hastalar kıyaslandığında artmış tam remisyon görülmüş ancak genel sağkalım etkilenmemiştir(75).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada klorambusil ile bendamustin karşılaştırılmış ve bendamustin grubunda daha iyi cevaba rağmen daha fazla toksisite görülmüştür. Genel sağkalıma etkisiz olduğu saptanmıştır(76).

Monoklonal antikorlar:

Glikozile aktive fosforlanmış bir protein olan CD20 görevi net olarak aydınlatılamamış hücre yüzeyinde bulunan bir B lenfosit işaretidir. 1998 yılında anti CD20 antikoru rituksimab gündeme geldikten sonra KLL de dahil olmak üzere pek çok B hücreli malignite tedavisinde iyileşme ve ilerleme sağlanmıştır(77). Tek başına kullanımdan ziyade KLL'de kombinasyon tedavilerinde daha başarılı olunmuştur.

Ofatumumab CD20'nin özel bir epitopuna bağlanan humanize edilmiş(insansılaştırılmış) antikordur. Yapılan bir çalışmada fludarabin ve alemtuzumab refrakter KLL hastalarında etkin bulunması üzerine FDA ve EMA tarafından kullanım onayı almıştır(78).

Obinutuzumab(GA101) CD20'nin tip 2 epitopuna bağlanan monoklonal antikordur. Rituksimab ile karşılaştırıldığında B hücrelerinde in vitro apoptozu artırdığı gösterilmiştir(79). KLL tedavisinde klorambusil ve obinutuzumab kullanımı ile ilgili klinik çalışmalar sürmektedir.

Alemtuzumab CD52 antijenini hedefleyen rekombinan bir monoklonal antikordur. Yüksek riskli olan KLL hastalarında (del17p, del11q ve TP53 mutasyonu olanlar) etkinliği

kanıtlanmıştır(63,80). Yapılan randomize kontrollü bir çalışmada klorambusil ile alemtuzumab karşılaştırılmış ve alemtuzmab tam yanıt ve genel yanıt bakımından daha iyi bulunmuştur. Ayrıca hastalığın ilerlemesi veya ölüm riskleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha faydalı bulunmuştur(80).

Onaylanmış tedaviler dışında çalışmaları süren çok sayıda ilaç bulunmaktadır. B hücre reseptörü KLL hücrelerinin yaşaması için oldukça önemlidir. BHR sinyal yolunun sürekli ve tekrarlayan şekilde uyarılması KLL hücrelerinin yaşam süresini uzatmaktadır(81). Bu sinyal yolağını etkileme potansiyeli olan tedaviler araştırılmaktadır. Bruton tirozin kinaz(BTK) BHR sinyal yolağında rol oynar. İbrutinib BTK'yi inhibe eden oral bir ilaçtır. Relaps/refrakter B hücreli lenfoma ya da KLL hastalarını araştırmaya alan bir çalışmada %16 hastada tam yanıt alınmış, bir başka çalışmada yüksek riskli, relaps/refrakter hastaların çoğunlukta olduğu grupta genel cevap %71 bulunmuştur(82,83).

Syk(spleen tirosine kinase) ekspresyonu KLL'de artmıştır ve tedavi açısından hedeflenen bölgelerden biridir(84) Fostamatinib ağızdan verilen bir Syk inhibitörüdür. Çalışmaları sürmektedir(85).

Malign lenfositlerde Fosfotidil İnositol 3 Kinaz yolağı aktivitesi artmış olup bu konuda da çalışmalar yapılmaktadır(86). İdelalisib(CAL-101, GS-1101) bu yolak üzerinden etkili ağızdan verilen bir tedavidir. KLL ile yapılan çalışmada genel yanıt %72 bulunmuştur(87).

Dasatinib Src- ve Abl-kinaz inhibitörü olup primer KLL'de apoptozu artırır. Yapılan Faz 2 çalışmada umut verici yanıt oranları görülmüştür(88).

Bcl-2 ailesi KLL'de apoptoz ve yaşam dengesinde önemli rol oynayan proteinlerden oluşur. Bcl-2 inhibitörlerinin KLL'de kullanımı ile ilgili çalışmalar sürmektedir. AT101 ve ABT-199 çalışmaları süren oral kullanılan bu yolağa etki eden ilaçlardır(89,90).

<u>İmmunmodülatörler:</u>

Lanelidomide ikinci kuşak thalidomide analoğu olup anti anjiojenik özellikleri olan bir immunmodülatördür. Miyelodisplastik sendromda, multiple myelomda kullanılmakta olan bu ilaç KLL tedavisinde de umut vermektedir. Lanelidomide monoterapisine yanıt oranları %32-%54 arasında gösterilmiştir(91,92,93). Rituksimab ile kombine kullanımında artmış cevap

alınmış ve toksik etkide belirgin artış olmamıştır(94). Diğer yandan rituksimab lanelidomide ve fludarabine kombinasyonu kullanılan çalışma ciddi yan etkiler nedeni ile sonlandırılmıştır(95).

Everolimus tedavisi KLL'de denenmiş ancak düşük yanıt oranları ve toksisite nedeni ile tercih edilmemiştir(96).

Kombinasyon tedavileri:

Tedavi etkinliğini artırmak ve daha az toksik yollar bulmak amacı ile kombinasyon tedavileri denenmektedir. Fludarabin pek çok diğer ajanla birlikte kullanılmıştır.

Fludarabin ve siklofosfamid kombinasyonu(FC) en çok kullanılan kombinasyondur. Relaps/refrakter KLL hastalarında bu tedaviye mitoxantrone eklenmesi ile %50 tam remisyon sağlanmıştır(97). Yüksek riskli olmayan KLL hastalarında da FC kombinasyonun sadece fludarabine göre ilk sıra tedavide başarı şansını artırdığı görülmüştür(98).

Kladribin kombinasyonları ek avantaj sağlamamıştır(99).

Kemoimmunoterapi

Rituksimab kullanılan kombinasyonlar:

Yapılan çalışmalarda fludarabin ile rituksimabın beraber kullanılması ile daha önceden kemoterapi almamış hastalarda toplam cevap oranının ve genel sağkalımın arttığı gösterilmiştir(100). Benzer şekilde FC alan hastalar ile FC'ye ek olarak rituksimab(FCR) alan hastalarının tedavi yanıtlarının karşılaştırıldığı çalışmalar yapılmış; FCR tedavisi ile toplam cevap oranı daha yüksek bulunmuştur. Hastalıksız sağkalım FCR alan grupta anlamlı olarak daha uzun bulunmuştur. Tüm prognostik gruplarda daha iyi bulunan bu tedavi yöntemi del17p için hayatta kalma süresini etkilememiştir(61). Benzer bulgular başka çalışmalarla da desteklenmiştir.

FCR tedavisine alemtuzumab eklenmesi ile %70 tam remisyon sağlanmış kısmi yanıt %18, toplam cevap %92 bulunmuştur(101).

Başka bir çalışmada FCR tedavisine mitoxantrone eklenmiş ancak ciddi nötropeni riski (%13) olması nedeni ile klinik araştırmalardan öteye geçmemiş, yaygın kullanıma

girememiştir(102).

Farklı bir tedavi şekli olarak FCR yerine pentostatin siklofosfamid rituksimab(PCR) verilmiş ve benzer sonuçlar elde edilmiştir(103).

İlk sıra tedavi olarak bendamustin ile rituksimab(BR) verilen KLL hastalarında toplam cevap %88, tam remisyon %23,1 bulunmuştur(104). Relaps KLL'de rituksimab ile bendamustin kombine edilmiş fludarabine dirençli hastalarda toplam yanıt %45,5, fludarabine yanıtlı hastalarda %60,5 bulunmuştur(105). Ancak bu hastaların %12,8 inde Grade 3- 4 nötropeni, tombositopeni ve anemi gibi ciddi yan etkiler olmuştur. Yapılan geniş bir çalışmada FCR ile BR karşılaştırılmış ve FCR daha yüksek tam yanıt, daha az minimal kalıcı hastalık ve daha uzun ilerlemesiz sağkalım ile üstün bulunmuştur(106).

Obinutuzumab ile kombinasyonlar:

Fiziksel olarak yandaş hastalıkları olan KLL hastalarından tedavi almamış olanlarda yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada obinutuzumab ve klorambusil kombinasyonu, rituksimab ve klorambusil kombinasyonundan daha üstün bulunmuştur(107).

Ofatumumab ile kombinasyon:

Klorambusil ile ofatumumab kombinasyonu fludarabin temelli tedavi alamayan yandaş hastalığı olan ve yaşlı hastalarda kullanılmış ve klinik açıdan önemli katkılar bulunmuştur(108).

Alemtuzumablı kombinasyonlar:

Alemtuzumab ile fludarabin kombinasyonu relaps KLL hastalarında Faz 2 bir çalışmada araştırılmıştır(109). FC'ye ek olarak alemtuzumab(FCA) kombinasyonu ile FCR karşılaştırılmış FCA kolunda toksisite fazlalığı nedeni ile erken bitirilmiş bu çalışmada FCR belirgin olarak daha üstün bulunmuştur(110).

Relaps veya refrakter hastalarda yapılan randomize kontrollü çalışmada fludarabin monoterapisi ile fludarabin ile alemtuzumab kombinasyonunun(FA) etkinliği karşılaştırılmış ve genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım süresi FA alan grupta daha uzun bulunmuştur.

Ancak diğer yandan kombinasyon grubunda ciddi yan etkiler daha fazla bulunmuştur. Toplam tedavi ilişkili mortalite benzer saptanmıştır(111).

Bir çeşit Bcl-2 antagonisti olan oblimersen ile ilgili yapılan çalışmada, FC ile oblimersen-FC kombinasyonu karşılaştırılmış genel sağkalıma olumlu katkı sağladığı bulunmuş ve tedavi açısından umut verici bulunmuştur(112).

Semptomatik olan ve TP53 veya del17p mutasyonu bulunan hastalara ilk sıra tedavide idelalisib veya ibrutinib tedavilerinden biri mutlaka önerilir. Bu tedavilere rituksimab eklenebilir. Yüksek riski olan bu hastalara ilk veya ikinci relapsta allojenik kemik iliği nakli önerilebilir(113).

İkinci sıra tedavi verilmesi gündeme geldiğinde hastalığın remisyon süresi göz önüne alınmaktadır. Relaps olmuş ancak asemptomatik hastalar tedavisiz izlenebilir. TP53 mutasyonu olmayan ve tedaviden 24-36 ay sonra relaps yada progresyonu olan hastalarda ilk sıra tedavi tekrarlanabilir. Daha kısa sürede relaps olanlarda yada ilk sıra tedaviye cevap vermeyen hastalarda tedavi değişikliği yapılır.

İkinci sıra tedavi seçenekleri şunlardır:

Kinaz inhibitörleri(idelalisib, ibrutinib)

Tek başına ya da herhangi bir klinik araştırma ilacı ile kombine Bcl-2 antagonistleri

Allojenik kök hücre nakli

Tek veya kombinasyon olarak alemtuzumab

Hastaların fiziksel durumları, ilaca ulaşabilme durumları ve moleküler sitogenetik bulguları bu tedavi seçeneklerinde önceliğin belirleyicisi olacaktır. Avrupa konsensus grubu önerilerine göre bir kinaz inhibitörüne rağmen relaps olan fiziksel olarak iyi olan refrakter KLL hastalarında kök hücre nakli öncelikli olarak önerilir(113). Ancak kinaz inhibitörlerine cevapsız ya da progrese olan hastalarda farklı bir kinaz inhibitörüne ya da Bcl-2 antagonistine geçilebileceği ve ikinci kez remisyon sağlanan hastalara allojenik nakil önerilebileceği görüşü de bulunmaktadır(32).

2.2. KALRETİKÜLİN(CRT)

Endoplazmik retikulum(ER) hücre içerisinde bulunan proteinlerin yaklaşık %30'unun hücre içinde veya dışında gidecekleri yere ulaşmadan önce uğradıkları, katlanmamış basit yapıda iken çeşitli şaperonlar ve enzimler ile karşılaşarak yapısal ve işlevsel bütünlüğe ulaştıkları hücre organelidir(114). Proteinler ER içine ulaştıktan sonra üç boyutlu konfigürasyonlarına ulaşırkan çeşitli şaperonların veya katlanma faktörlerinin denetiminden geçmektedir. Şaperonlar bu proteinleri kontrol ederken hiç katlanamamış veya yanlış katlanmış proteinleri fark eder ve hatalı ürünler proteozomal yıkım için gönderilir. ER içinde hücrenin tam olarak çalışabilmesi için gereken bu enzimatik olaylar ve işlenme süreci bir yandan sürmekte iken diğer yandan ER'nin önemli bir işlevi ise kalsiyum için depo görevi görmesidir. Özellikle kas hücrelerinde sarkoplazmik retikulumda depolanan kalsiyumun sitozole geçişi ve tekrar sarkoplazmik retikuluma alımı dinamik bir döngüdür.

Kalretikülin ilk kez 1974'te D.H.Maclennan tarafından iskelet kasının sarkoplazmik retikulumunda kalsiyuma yüksek afinite gösteren bir protein olarak tanımlanmış ilerleyen zamanlarda kalretikülinin diğer işlevleri de keşfedilmeye başlanmıştır(115). Literatürde geçen diğer isimleri CRT, otoantijen RO, kompleman komponent C1q reseptörüdür (CCC1QR).

2.2.1. Kalretikülinin yapısı

Bu protein 46-kDa olup şaperon aktivitesinden sorumlu türler arasında korunmuş N-terminus, prolinden zengin ve şaperon aktivitesine katkı sağlayan P-bölgesi ve kalsiyum metabolizmasından sorumlu yüksek asidik olan C-terminustan oluşmaktadır(116).

N-terminus 8 tane antiparalel beta banttan oluşur(117). Şaperon aktivitesinden sorumlu olan asıl bölge burasıdır. Bunun yanında N-terminus bölgesinin alfa integrinlerle etkileşebildiği ve çekirdekteki glukokortikoid reseptörünün DNA'ya bağlanan domaini ile etkileştiği gösterilmiştir(9,118).

P-bölgesi prolinden zengin tekrarlayan aminoasit sekanslarından oluşan N-terminus ve C-terminus arasında kalan bölümdür. Bu bölge şaperon aktivitesine katkı sağlar, ER içinde yer alan ve proteinlerin oksidatif katlanmasında görev alan ERp57 ile konjuge olarak proteinlerin doğru katlanmasını düzenler(119,120). Yapılan in vitro çalışmalar bu bölgenin de

kalsiyum bağlayabildiğini göstermiştir. Kalsiyuma yüksek afinite ve düşük kapasite ile bağlanır(121,122).

C-terminusun içerdiği aminoasitler nedeni ile negatif yükü oldukça fazladır. Kalsiyumun en çok bağlandığı yer burasıdır. Düşük afinite ve yüksek kapasite ile kalsiyumu bağlar. Özelikle kas hücrelerinde kalsiyumun hücre içindeki bu döngüsü önemlidir. ER içerisinde bulunan kalsiyum rezervinin %50'sinden fazlası kalretiküline bağlı halde bulunur(123).

2.2.2. Kalretikülinin görevleri

Kalretikülinin asıl bulunduğu yer ER'dir. Sonradan yapılan çalışmalarla sitozolde, hücre yüzeyinde ve hatta hücre dışı matrikste de bulunabildiği gösterilmiştir. CRT hakkında bilgiler arttıkça hücrede bulunduğu yere göre farklı görevler üstlendiği ortaya konmuştur. İlk farkedilen ve önemli bir görevi kalsiyum metabolizmasında yer almasıdır. CRT kalsiyumun ER içinde ve dışında depolanması işleminin düzenlenmesinden sorumlu olup ER içinde merkezi tampon olarak görev yapar. CRT yokluğunda kalsiyum salınımı bozulacağından kalsiyum sinyal yolaklarının çoğu işlev kaybına uğrar(123). Artmış CRT düzeyleri artmış hücre içi kalsiyum birikimine yol açabilir(121).

Zamanla yapılan çalışmalarla gösterilen diğer bir CRT işlevi hücre içinde ve ER içinde yaşanan stres durumunda ortamın fizyolojik duruma getirilmesidir. Isı veya ağır metaller gibi stres varlığında CRT üretiminin arttığı görülmüştür(124). Hiperosmolar stres sırasında böbrekte henle kulpunda bulunan hücrelerin adaptasyonunda kalretikülinin önemli olduğu saptanmıştır(125).

ER içinde CRT'nin çok önemli asıl işlevi kalretikülin/kalneksin döngüsünün sağlanmasıdır. Kalretikülin ve kalneksin polipeptid ve lektin bağlayarak saf glikoproteinlerin katlanmasında düzenleyici olarak işlev görür. Glikoproteinlerin üretilmesi, kalite kontrolünün sağlanması, endoplazmik retikulumda katlanması ve sekresyonu basamaklarında yer alır. Glikozillenmiş proteinler son hallerine gelmeden ER içinde çeşitli aşamalardan geçmektedir. CRT son glukoz kalıntısının glukosidaz 2 tarafından ayrıştırılması sırasında proteinin yapısını kontrol eder(126). Proteinlerin yanlış katlanması, yanlış yönlendirilmesi veya hatalı katlanmış

proteinlerin ER üzerinde sitozole yönlendirilememesi nedeni ile hücre düzeyinde hatalı bir süreç başlamakta ve klinik olarak hastalıklar ortaya çıkabilmektedir.

Birçok hücresel olayda fonksiyon gösteren kalretikülinin ek fonksiyonları zamanla ortaya konmuştur. CRT'nin in vivo ortamda çekirdekteki androjen reseptörünün hormon duyarlı DNA elementine bağlanmasını engellediği ve androjen reseptörü ve retinoik asit reseptörünün transkripsiyonel aktivitelerini inhibe ettiği gösterilmiştir(127).

Pek çok hücrenin farklılaşması kalsiyum ile ilgili yolaklara bağlı olup adiposit farklılaşması da bunlardan biridir. Kalretikülinin eksik olduğu hücrelerde adiposite dönüşümün arttığı gösterilmiştir. CRT artışı ile lipoprotein lipaz, peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR) ekspresyonu azalmıştır(128). Bozulmuş CRT olduğunda osteogenez bozulmuştur(129).

CRT'nin ER dışında ekstraselüler matrikste bulunması yüzeysel yara iyileşmesi ile ilişkili bulunmuştur(130). Sitozol içinde bulunan CRT için görev aldığı tüm olaylar henüz aydınlatılamamıştır. Sitozolde yer aldığında hücrelerin adezyonunda görev alan CRT'nin bu işlevi alfa integrinin sitozolik kuyruğu ile olan ilişkisine bağlanmıştır(118,131,132). Kalretikülinin RNA stabilitesinin ayarlanmasında görev aldığına dair bazı çalışmalar bulunmaktadır(133,134).

Kalretikülin eksikliğinde embriyonik miyofibrillogenez bozulmuş olup bu eksiklik durumu yaşamla bağdaşmaz(135). Kalpte artmış CRT sunumu aritmilere ve kalp bloklarına yol açmaktadır(129).

Hücre içinde bulunduğunda birçok önemli rolünün yanında son zamanlarda fark edilen ve özellikle hücre yüzeyinde iken katıldığı olaylar daha dikkat çekici bulunmuştur. Kalretikülin hücre yüzeyinde bulunduğunda hücresel çoğalma, apoptoz ve immünojenik hücre ölümü gibi yaşamsal çok önemli olaylarda da işlev görür.

Bağışıklık ile CRT ilişkisi dikkat çekicidir. Hücre yüzeyinde CRT bulunduğunda C1q ile etkileşerek klasik kompleman sistemini aktive edebilir(136,137).

CRT hücre içi proteinlerin sunulmasında görevli MHC sınıf 1 peptid yükleyen kompleksin integral bir parçasıdır. Antijen sunumunda ve adaptif bağışıklıkta görev almaktadır.

Ekzojen CRT'nin direk olarak granülositlere ve monositlere bağlanarak proinflamatuar sitokinlerin artışı ile doğal bağışıklığı artırdığı düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada aktive olmuş T lenfositlerde hücre yüzeyinde bulunan CRT miktarının arttığı saptanmıştır(138).

Apoptoz programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılır. Uygun zamanda ve uygun şartlarda yok edilmesi gereken hücreler ortadan kaldırılır. Apoptoza uğrayacak hücreler yüzeylerinde fosfotidil serin bulundururlar. Apoptotik hücre yüzeylerinde fosfotidil serinin yanı sıra CRT varlığının da önemli olduğu gösterilmiş ve bir tür apoptoz belirtisi olduğu düşünülmüşür. Yüzeyinde CRT taşıyan hücrelerin fark edildiği ve fagositozdan sorumlu hücre tarafından içeri alınarak yok edildikleri bilinmektedir(10).

CRT hücreyi 'derleyip toparlayan' bir görev üstlenmiş olup birçok hastalıkla bağlantılı bulunmuştur. Bazı nörodejeneratif hastalıklar, alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı, obezite ile ilişkili tip 2 DM gibi pek çok klinik alanı ilgilendiren hastalık ile kalretikülin arasında ilişki kurulmuştur. Ig A nefropatili hastaların böbrek biyopsilerinde tübüler epitel hücrelerinde anlamlı olarak artmış kalretikülin gösterilmiştir. Kalretiküline karşı oluşmuş immünglobülinler romatoid artrit hastalarında fark edilmiş ve hastalıkla ilişkili olduğu düşünülmüştür(115).

2.2.3. Kanser ile kalretikülin ilişkisi

Makrofajların tümör hücrelerini hedefleyerek bunları fagosite etmesi programlı hücre ölümü olarak adlandırılmaktadır. Makrofaj yüzeyindeki CRT sunumunun artması ile tümör hücrelerinin tanınması ve öldürülmesinin arttığını gösteren bulgular vardır. Ayrıca klonal antijene özgü T hücre çoğalması ve dentritik hücreler yoluyla tümör hücrelerinin öldürülmesinin sağlandığı ile ilgili veriler sunulmuştur(115,139).

Sitotoksik T hücreleri özel faktörler, kalsiyum ile aktive olan perforin ve granzimlerle hedeflenen hücreleri yok ederler. T hücrelerinden salgılanan granülün içinde perforin ile birlikte CRT bulunmaktadır. CRT eksik hücrelerde CRT'nin sitolitik aktivite için şart

olmadığı ancak etkin hedefleme ve sitotoksik T hücrenin hedef hücreyle temasında önemli olduğu gösterilmiştir(140). İn vivo yapılan bir çalışmaya göre CRT'nin endotel hücrelerinde adezyon moleküllerini ve lökosit endotel ilişkisini NF-κB aktivitesi ile arttırdığı gösterilmiştir. Tümör endotel hücrelerinde artan adezyon molekülleri sayesinde tümör içine lökosit infiltrasyonu artmış ve immunoterapinin etkinliği CRT verilmesi durumunda artmıştır(141).

Normalde yanlış katlanmış proteinlere verilen hücre cevabı hücre ölümü ya da homeostazın sağlanarak hücre fonksiyonunun normal hale getirilmesi şeklinde olur. Üçüncü bir yol ise hücre ölümünün uyarılmasına rağmen sebat eden ER stresi altında metabolik yolaklardaki fonksiyonel bozulma durumu ve organ hasarı riskinin sürmesidir. Son yıllarda kalretikülin ve diğer şaperonların bu gibi hastalıklı durumlardaki rolleri üzerine yeni bilimsel veriler oluşmaktadır.

Kalretikülinin ve diğer şaperonların hücre yüzeyine yerleşmesi kanser hücrelerine karşı hem doğal hem de adaptif immüniteyi artırmakta ve kemoterapiye karşı duyarlılığı artırmaktadır(115). Antrasiklin kullanımının hücre yüzeyinde artmış CRT sağlayarak tümör hücrelerinin immünojenik hücre ölümü ile yok edildiği gösterilmiştir(142). Diğer yandan kanser hücrelerinde antifagositik bir sinyal olan CD47 ile CRT'nin hücre yüzeyinde birlikte arttığı da gösterilmiştir(143). Akut miyeloid lösemi hastalarında blast hücre yüzeyinde CRT varlığı ile tümör antijenlerine karşı artmış immun yanıt gösterilmiştir(144).

İlaca karşı direnç oluşumunda CRT ve diğer şaperonların adları geçmektedir. Yapılan bir çalışmada ovaryen kanserlerde yüksek tümöral CRT sunumu antrasiklin tedavisinde artmış immünojenik hücre ölümüne dair bazı bulgular vardır(145). Çalışmalar göstermiştir ki mide kanseri ve meme kanserinde kanserin evresi ve lenf nodu metastazı ile CRT arasında pozitif ilişki vardır(146,147). Mesane kanseri dokusunda artmış CRT varlığının yanı sıra idrardaki CRT düzeyinin mesane kanser tanısında kullanılabileceği fikri ortaya atılmıştır(147). Ağız skuamoz hücreli kanserde CRT azaldığında hücre döngüsünün G0/G1 fazında kaldığı gösterilmiştir(149). Diğer yandan nöroblastomda artmış CRT ile hücrelerin daha diferensiye oldukları bağlantısı kurulmuş ve bu olgularda daha iyi prognoz olduğunu savunan çalışmalar da olmuştur(150).

Kalretikülini kodlayan gen CALR olarak adlandırılır. 19 kromozomun p kolunda toplam 9 exondan oluşur(151,152). Yüksek polimorfizm göstermez ve insan genomunda tek kopyadır.

Kalretikülin mutasyonları 2013 yılında tanımlanmış ve ilk olarak BCR-ABL negatif miyeloproliferatif neoplazili hastalarda gösterilmiştir(11,153). Mutant CRT ER'de gösterilmiş hücre yüzeyinde artış ya da golgide birikim olmamıştır(153). Bu gendeki mutasyon ile hastalık ilişkisi gösterildikten sonra da benzer çalışmalar ardı ardına yapılmış ve hastalıklar ile CALR mutasyon ilişkisi kurulmaya çalışılmıştır. Esansiyel trobositozda %25-30, primer miyelofibrosiste %20-35 sıklıkla CALR mutasyonu saptanmıştır(11,153,154). Miyelodisplastik sendromda ve Trombositozun Eşlik Ettiği Ring Sideroblastlı Refrakter Anemi hastalarında ise daha az sıklıkla saptanmıştır(154).

CALR mutasyonlarında her zaman exon 9 etkilenir. Tüm mutasyonların aynı olmadığı düşünülmekte ve pek çok yeni mutasyon yapılan çalışmalarla ortaya konmaktadır. Gösterilen mutasyonlar insersiyon veya delesyon şeklinde olup sıklıkla çerçeve kaymasına neden olmaktadır(11). En sık görülen mutasyonlar tip 1 (52 baz çifti delesyonu) ve tip 2 (5 baz çifti insersiyonu) sırası ile tüm mutasyonların %53 ve %32'sini oluşturur(155). CALR mutant hastalarda en sık mutasyonun tipinde JAK2 Kinazın dimerizasyonu artmakta ve miyeloid öncüllerde kalıcı bir JAK-STAT yolağı aktivitesi ile onkojenik bir durum meydana gelmektedir(115).

Bazı CALR mutasyonlarında üçün katları şeklinde baz çiftlerinde delesyon ya da insersiyon ya da ardışık olmayan insersiyon ve delesyonlar görülmekte ve çerçeve kaymasına neden olmazken bazı mutasyonlarda çerçeve kayması olur. Bu durum klinik açıdan tüm mutasyonların eşit önem taşımaması ile sonuçlanacağı anlamı taşır(155).

3.MATERYAL VE METOD

1. Materyal

Hasta Grubu

Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'nda KLL tanısı ile takip edilmekte olan ve daha önceden bu hastalığa yönelik tedavi almamış olan hastalardan çalışmaya katılmayı kabul eden 39 hasta dahil edildi. Çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'na başvurularak 789 nolu karar ile onay alındı. Hastalardan aydınlatılmış gönüllü olur formu alındı. İlgili form ek 1'dedir. Hastaların polikliniğe başvurdukları tarih itibariyle KLL tanıları, International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia tarafından 2008 yılında güncellenen National Cancer Institute–Working Group Kılavuzuna ve 2015 KLL: Tanı Tedavi ve İzlem Kılavuzuna göre doğrulandı. KLL tanısı alan hastaların demografik özellikleri, fizik muayene bulguları, tanı sırasındaki laboratuvar değerleri ve Binet ve Rai evreleri, patoloji raporları, sitogenetik ve mutasyon analizleri geriye dönük olarak incelendi. Hastaların tanı ve takibi sırasında tanıya en yakın tarihli laboratuar değerleri baz alınıp dosyalardan ilk tanı tarihi poliklinik başvurusundan önce olan hastaların ulaşılabilen tanı tarihine en yakın laboratuar sonuçları değerlendirmeye alındı. Çalışmaya dahil edilen olgulardan CALR gen mutasyonu çalışılması amacıyla onamları alınarak 4 cc periferik kan örneği alındı.

2.Metod

Moleküler Tanı Testleri

a) DNA İZOLASYONU

Hastalardan alınan periferik kan örneklerinden High Pure PCR Template Preperation Kit (Roche) kullanılarak DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Kan örneklerinin 200 µl' si ependorf tüpüne aktarılmış, tüpe 200 µl Binding Buffer eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Ardından 40 µl Proteinaz K eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Tüp vortekslenmiş ve 70°C' de 10 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda tüpe 100 µl izopropanol eklenmiş, pipetaj yapılmış ve tüm solüsyon filtreli tüpe aktarılmışıtr. 8000 Rcf' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Filtreli tüpün altındaki ependorf atılmış, fitreli tüp yeni ependorfa yerleştirilmiştir. Filtreli tüpe 500 µl Inhibitor Removal Buffer eklenmiş ve 8000 Rcf' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Alt tüp atılmış yenisi yerleştirilmiştir. Filtreli tüpe 500 µl Washing Buffer eklenmiş ve 8000 Rcf' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Altta kalan sıvı atılmış ve aynı 46 işlem tekrarlanmış, alt tüp atılmış, yenisi yerleştirilmiştir. 13000 Rcf' de 10 saniye santrifüj edilmiştir. Filtreli tüp DNA'nın

saklanacağı ependorfa yerleştirilmiştir. 70°C' de ısıtılmış olan Elution Buffer' dan 50 µl eklenmiş 10 saniye beklenmiştir. 8000 Rcf' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. DNA'nın içinde toplanmıştır. Ependorf tüpü hasta bilgileriyle etiketlenerek -20°C' ye kaldırılmıştır.

b) PCR

İzole edilen DNA örneklerinden, CALR geni exon 9 bölgesine özgü (M13 kuyruklu) Tablo.3' teki primerler kullanılarak, Tablo.4'te belirtilen protokoller ve thermal cycler programı ile polimeraz zincir reaksiyonu yapılmıştır.

Tablo.3 Primerler

Primer	Dizi
exon9 Forward primer	5'CGG TGT TCC TTG TCT TCT C'3
exon9 Reverse primer	5'ACA GAG ACA TTA TTT GGC G'3

Tablo.4a PCR Protokolleri

AmpliTaq Gold 360 Master Mix (ThermoScientific USA)	6 µl
Forward Primer (10 pmol)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol)	1 µl
GC Enchancer Buffer	1 µl
DNA (30-50ng/ µl)	1 µl
Toplam Hacim	10 µl

Tablo.4b PCR Thermal Cycler Programı

95° C	10 dakika	
95° C	30 saniye	35 döngü
61° C	45 saniye	
72° C	45 saniye	
72° C	7 dakika	
4° C	sonsuz	

c) PCR ÜRÜNLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Amplifikasyon ürünleri ExoSAP-IT® (Affymetrix,USA) kullanılarak enzimatik yöntem ile Tablo.5' te belirtilen protokol ile purifiye edilmiştir.

Tablo.5a Pürifikasyon Protokolleri

PCR Ürünü	5 µl
ExoSAP-IT®	2 µl

Tablo.5b Pürifikasyon Thermal Cycler Programı

37° C	30 dakika
80° C	15 dakika
4° C	sonsuz

d) CYCLE SEQUENCING PCR

Purifiye edilen PCR ürünleri BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Scientific,USA) kullanılarak Tablo. 6' da belirtilen protokol ile "Cycle Sequencing PCR" reaksiyonu yapılmıştır.

Tablo.6a Cycle Sequencing PCR Protokolleri

BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	2 µl
M13 Sequencing Primer (5 pmol)	1 µl
5x Sequencing Buffer	3 µl
ddH2O	2 µl
Pürifiye pcr ürünü	2 µl
Toplam Hacim	10 µl

Tablo.6b Cycle Sequencing Thermal Cycler Programı

96° C	1 dakika	
96° C	10 saniye	25 döngü
50° C	5 saniye	
60° C	4 dakika	

e) CYCLE SEQUENCING SAFLAŞTIRMA

Cycle Sequencing PCR ürünleri ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ (Zymo Research , USA) kiti kullanılarak üretici protokolüne göre purifiye edilmiştir.

9 KAPİLLER ELEKTROFOREZDE DİZİ ANALİZİ

Pürifiye edilmiş Cycle Sequencing PCR ürünleri 3500 Genetic Analyzer otomatik DNA dizi analiz cihazında (Thermo Scientific,USA) kapiller elektroforez yapılmıştır. Elde edilen DNA dizileri referans dizi ile karşılaştırılarak "Sequencing Analysis" Programında analiz edilmiştir.

4.BULGULAR

Çalışmamıza Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Hematoloji Bölümünde takip edilen 39 KLL hastası alındı. Bu hastaların tanı anındaki ortanca yaşı 56(43-89) bulundu. Ortalama tanı yaşı 58,28'di.

KLL hastalarının 21'i (%53,84) erkek, 18'i (%46,16) kadındı. Erkek kadın oranı 1,16 bulundu.

Tanı anındaki Binet evrelemesine göre 27 hasta (%69,24) evre A, 11 hasta (%28,2) evre B, bir hasta (%2,56) evre C idi. Modifiye Rai evrelemesine göre 23'ü (%58,98) düşük riskli, 15'i (%38,46) orta riskli ve biri (%2,56) yüksek riskli gruptaydı.

Tablo 7: KLL hastalarının klinik özellikleri

	Hasta sayısı	Yüzde (%)
Erkek / Kadın	21 / 18	53,84 / 46,16
Tanı yaşı < 65 / ≥ 65	28 / 11	71,8 / 28,2
Tanı anında Binet evresi A / B / C	27 / 11 / 1	69,24 / 28,2 / 2,56
Tanı anında Modifiye Rai evresi düşük /orta /yüksek	23 / 15 / 1	58,98 /38,46 /2,56

Tanı anında hastaların Beyaz küre(BK) sayıları 4700- 387900/mm3 aralığındaydı ve ortanca BK sayısı 22500/mm3 bulundu. Lenfosit sayısı 700-236100/mm3 aralığında olup ortanca 17500/mm3 saptandı. İlk tanı döneminde Hb 4,6-17,8 g/dL aralığında ve ortanca Hb 13,4 g/dL saptandı. Trombosit sayısı tanı anında 88-487 milyon/mm3 aralığında olup ortanca 210 milyon/ mm3 saptandı.

Tanı sırasında hastaların LDH düzeyleri 136-1055 U/L aralığında bulundu. Ortanca

LDH değeri 208 U/L olup 2 hastada (%5,12) LDH belirlenen üst sınırın iki katı veya üzerindeydi.

Tablo 8: Tanı anındaki laboratuar bulguları

Tanı anında	En düşük-En yüksek	Ortanca
BK(/mm3)	4700-387900	22500
Lenfosit(/mm3)	700-236100	17500
Hb(g/dL)	4,6-17,8	13,4
Plt(1000/mm3)	88000-487000	210000
LDH(U/L)	136-1055	208

Hastaların 31'inde (%79,48) IgG düzeyine bakılmıştı. IgG 11,1-1750 mg/dL aralığında ortalama 979 mg/dL bulundu. Ig G ortanca değeri 993 saptandı. 29 hastada (%74,35) IgM düzeyine bakılmıştı. IgM düzeyi <20-158,5 mg/dL aralığında idi. 29 hastada (%74,35) IgA düzeyi ölçülmüş 50,7-688 mg/dL aralığında idi.

B2- mikroglobulin düzeyi 15 hastada (%38,46) ölçülmüştü. B2- mikroglobulin düzeyi 1,3-6,7 mg/L aralığında ve ortanca 2,39 mg/L bulundu.

Akım sitometride 39 hastanın 24'ünde (%61,53) CD38 %30'un altında, 10'unda (%25,64) CD38 %30 'un üzerinde saptandı. Beş hastada (%12,82) akım sitometri yapılmamıştı. Akım sitometri yapılan hastalar içinde CD38 ekspresyonu 30'un üzerinde olanlar %29,41 saptandı. Akım sitometri yapılmamış hastaların ikisi kemik iliği biyopsisi, biri lenf nodu biyopsisi ile tanı almıştı. İki hastanın ilk tanısı bölümümüze başvuru öncesinde konduğu için akım sitometri sonuçlarına dosyalarından ulaşılamadı.

Hastaların yedisinin (%17,94) tanısı kemik iliği veya lenf bezi biyopsisi ile desteklenmişti. 39 hasta içinde biri (%2,56) SLL tanısı ile izlenmekte idi.

Hastaların ikisinde (%5,12) birinci derece akrabalarda KLL tanısı olduğu görüldü.

Hastaların biri (%2,56) polisitemia vera ve ikisi (%5,12) akdeniz anemisi tanısı ile izlenmekteydi.

Çalışmaya katılan iki hasta (%5,12) steroid almıştı. Bunlardan bir tanesine B semptomlarının şiddetini azaltmak, bir tanesine ise bulky kitle nedeni ile steroid tedavi verilmişti. Bulky kitlesi olan hastanın del11q mutasyonu bakılmamıştı.

Hastaların ikisi (%5,12) intravenöz immunglobulin tedavisi almıştı. Bu hastaların sık enfeksiyon nedeni ile tedavi aldıkları saptandı.

39 hastanın beşinde (%12,82) ikinci bir malign hastalık öyküsü olduğu bulundu. Hastaların KLL'ye ek olarak birinde (%2,56) tiroid papiller kanseri, birinde (%2,56) cilt bazal hücreli karsinom, birinde (%2,56) renal hücreli karsinom, ikisinde (%5,12) prostat karsinomu tanıları vardı.

Tablo 9: İkincil kanser dağılımı

İkinci malign hastalık	Hasta sayısı	Yüzde (%)
Tiroid papiller kanseri	1	2,56
Prostat karsinomu	2	5,12
Cilt bazal hücreli karsinom	1	2,56
Renal hücreli karsinom	1	2,56

Hastaların 17'sine (%43,58) 17p del mutasyonu bakılmıştı. 22 kişinin mutasyon durumu bilinmiyordu. Mutasyon durumu bilinen hastaların içinde 17p del sıklığı %11,76 saptandı. Hastaların 10'unda del11q mutasyonu bakılmış olup mutasyon durumu bilinenler içinde iki hastanın (%20) mutasyonu pozitifti.

Çalışmamızda 13q14.3 mutasyonu bakılan toplam sekiz kişi olup beşinde mutasyon saptanmıştı. Mutasyon durumu bilinenler içinde del13q14.3 mutasyon sıklığı %62,5 saptandı.

Çalışmamız sırasında 39 hastanın tümüne CALR geni exon 9 mutasyonuna bakıldı. Analizde hiçbir hastada CALR mutasyonu saptanmadı.

Tablo 10: Mutasyon dağılımları

Mutasyon çeşidi	Hasta sayısı	Yüzde(%)
17p delesyonu Bilinmiyor / + / -	22 / 2 / 15	56,42 / 5,12 / 38,46
11q22 delesyonu Bilinmiyor / + / -	29 / 2 / 8	74,37 / 5,12 / 20,51
13q14.3 mutasyonu Bilinmiyor / + / -	31 / 5 / 3	79,49 / 12,82 / 7,69
CALR mutasyonu Bilinmiyor / + / -	0 / 0 / 39	0 / 0 / 100

5. TARTIŞMA

KLL özellikle ileri yaştaki bireylerde daha sık görülen bir lösemi tipi olup Dokuz Eylül Üniversitesi Hematoloji Bölümü'nde takipli olan hastaların tanı anındaki yaş ortalaması da 58,28 bulunmuş olup literatür ile kıyaslandığında daha genç oldukları görüldü. Bu durumun nedeni geçmiş yıllara nazaran son yıllarda daha sık kan sayımı yapılması ve hastaların erken dönemde hematolojiye yönlendirilmesi olabilir. Yavaş seyir gösteren bu hastalıkta ilk tanı yaşının küçüldüğü konusunda benzer bulgular başka çalışmalarda da saptanmıştır(23). Çoğu asemptomatik olan KLL hastaları sıklıkla rutin kontroller sırasında fark edilen BK ve lenfosit sayısındaki artış ile tanı almaktadır. Tanı anındaki lenfosit sayısının yüksek olması artmış mortalite ile bağlantılı bulunmuştur(48).

Çalışmamızda hastaların büyük çoğunluğu modifiye Rai sınıflamasına göre düşük ve orta riskli hastalardan oluşmakta idi. Hastalardan sadece biri yüksek riskli grupta yer almaktaydı. Çalışma tasarlanırken sitotoksik tedavi almamış hasta grubunun seçilmiş olması nedeni ile erken ve orta evre hastalar çoğunlukta bulunmuş olabilir. İleri evre hastalarda kısa sürede tedaviye başlanması nedeni ile bu hastalardan çalışmaya katılım sınırlı sayıda olmuş olabilir. Bu durum çalışmamız açısından kısıtlayıcı bir faktör olmuştur.

Hastaların tanı sırasında değerlendirilen evreleri yapılan ayrıntılı fizik bakı ile belirlenir. Takipleri sırasında evrenin ilerlemiş olabileceği göz önüne alınarak her görüşmede hastanın ayrıntılı lenf bezi ve karaciğer dalak muayenesi yapılması önerilmektedir. Çalışmamızda hastaların evreleri konusunda tanı anının seçilme nedeni takip sırasında evrelerinin değişmiş olabileceği düşüncesidir. Evrelerin belirlenmesinde görüntüleme şart olmamakla birlikte yararlı olabilmektedir. Hastaların izleminde de eskiden görüntüleme tetkikleri rutin önerilmiyorken artık tümör yükünü göstermesi açısından tercih edilebileceği konusunda görüşler bulunmaktadır(32). Ancak görüntüleme yapılması şart değildir. Özellikle ilaç saha araştırmaları gibi çalışmalarda ise görüntüleme yapılması teşvik edilir. Çalışmamızda hastaların fizik bakı ile yapılmış değerlendirmeleri ve varsa görüntüleme yöntemleri ile saptanan organomegali veya lenf nodları boyutlarından yararlanarak evreler doğrulanmıştır.

Hastalarda organomegali değerlendirilirken KLL dışında buna yol açabilecek kist veya siroz gibi ek patolojik durumların göz önüne alınması doğru evreleme için gereklidir.

Hastalığın evresinin belirlenmesinde anemi ve trombositopeninin doğru değerlendirilmesi önemlidir. Anemiye ve trombositopeniye yol açacak diğer nedenlerin dışlanması ve hastalık ile ilişkili olan anemi ve trombositopeninin kanıtlanması önerilir(32). Çalışmamızda hastaların ikisinde akdeniz anemisi olduğu görülmüş evrelemede değerlendirmeye alınmıştır. Ayrıca demir eksikliği anemisi gibi düzeltilebilir sebepler göz önüne alınarak hastaların geçmişte değerlendirilip değerlendirilmediği hasta dosyalarından kontrol edilmiştir. Trombositopeninin periferik yayma ile teyit edilmesi önemlidir. Çalışmamızda bir hastada trombosit sayısı 88 milyon/mm3 bulunmuş olup yaymada 100 milyon/mm3 üzerinde olması nedeni ile evreyi etkilemediği kabul edilmiştir. Ancak tüm hastalar için laboratuar değerleri esas alınmış olup verilere değiştirilmeden yazılmıştır. Çalışma süresi öncesinde KLL tanısı almış olan hastaların geçmiş dosyalarından ulaşılabilen hastalık dönemlerine en yakın laboratuar değerleri esas alınması nedeni ile tanı anındaki değerler tüm hastalar için birebir yansıtıcı olmayabilir.

Çalışmamızda erkek kadın oranı KLL hastalığı için 1,16 olarak bulunmuştur. KLL hastalığı erkeklerde daha sık görülmekte olup çalışmamız literatür ile uyumlu bulunmuştur(20,24,25).

DSÖ kriterlerine göre KLL ve SLL aynı patolojik hücre grubundan köken almakla birlikte klinik olarak lösemik ya da nodal öğelerin baskın olmasıyla birbirlerinden ayrılırlar. KLL tanısının aksine SLL'de biyopsi alınması önerilmektedir. Çalışmamıza katılan tek SLL hastasının da tanısı lenf nodu biyopsisi ile konmuştu.

KLL hastalığının diğer hematolojik malignitelerden ayrımının yapılması için akım sitometri önerilmektedir(32). Tanı konması için kemik iliği veya lenf nodu biyopsisine gerek görülmez. Çalışmamızda 34 hastada tanı akım sitometri ile desteklenmişti. Akım sitometri yapılmayan hastaların tanısı rutinde önerilmemesine rağmen kemik iliği veya lenf nodu biyopsisi ile konmuştu. KLL ile açıklanamayacak sitopenilerde kemik iliği biyopsisi, hızlı tümör büyümesi ve klinik ağırlaşma olması durumunda Richter transformasyonu açısından lenf bezi biyopsisi alınabilir. DBBHL ve Hodgkin Lenfoma(HL) KLL hastalarının% 2-15'inde izlem sırasında gelişebilmekte ancak bu yavaş seyirli hastalığın neden hızlı bir şekilde ilerlediği konusu henüz netleşmemiştir(32).

KLL hastalarında hipogamaglobulinemi ile ilişkili enfeksiyonlar görülebilir(156). KLL

hastalarında sık enfeksiyon riski taşıyan hastalar için intravenöz immunglobulin verilebileceğine dair öneriler bulunmaktadır. Ancak mortaliteyi azaltıcı olduğu konusu tartışmalıdır. Bu nedenle yan etkileri de göz önüne alınarak hasta bazında tedavi kararı verilmesi önerilir(156). Çalışmamıza katılan iki hastada immunglobulin tedavisinin enfeksiyon riskini azaltma amacı ile verildiği saptandı.

KLL hastalarında otoimmun hemolitik anemi ve trombositopeni görülebilmektedir. Çalışmamızda ileri evre olan hastanın anemisi de otoimmun hemolitik anemi olarak değerlendirildi. KLL hastalarında ciddi anemi ve trombositopeni nedeni ile mortalite artmakta olup replasman gerektirecek düzeyde anemi ve trombositopeni görülebilir. Hastalık ilişkili anemi ve trombositopeni tedaviye başlama endikasyonu oluşturur(32).

KLL'de ikincil malignitelerin sıklığı artmıştır. Genellikle solid organ tümörleri görülmekte ancak sekonder miyelodisplastik sendromlar ve akut miyeloid lösemi sıklığının da arttığı gösterilmiştir(31,32). Çalışmamızda saptanan ikincil kanser sıklığı %12,8 olup, bunların literatür ile benzer şekilde solid organ maligniteleri olduğu görüldü.

KLL'de CD38 ekspresyonu %30 sınırının üzerinde kısa tedavisiz izlem süresi, kötü tedavi yanıtı, kısa ilerlemesiz sağkalım ve genel sağkalımla ilişkili bulunmuştur(64,65). Bu nedenle hastaların değerlendirilmesinde akım sitometride CD38 düzeyi bakılmasının önemli olduğu düşünülmektedir. Çalışmamız prospektif olmaması nedeni ile prognoz açısından verilere ulaşılamamıştır ancak her hasta içim akım sitometri sırasında CD38 bakılması önerilmelidir.

Hastalığın prognozu ile ilişkili olan sitogenetik, IGHV mutasyonu ve ZAP-70 pozitifliği önemli prognoz göstergeleri olarak öne çıkmalarına rağmen tetkik edilmelerindeki bazı teknik güçlükler nedeniyle güncel klinik pratikte yeterince yararlanılabilir duruma gelmemişlerdir. Bizim çalışmamızda da bu belirteçlerle ilgili veri bulunmamaktadır.

Geçmiş yıllarda mutasyonların prognoza olan etkileri biliniyor olmasına rağmen tedavi kararını verirken mutasyon analizi yapılmasının gerekli olmadığı düşünülmekteydi. Son yapılan çalışmalar ışığında hastanın mutasyon durumu tedavide verilecek rejimi etkilemektedir(18,32). Hastanın del17p veya TP53 mutasyonu bulunup bulunmamasına göre tedavi önerileri değişir. Çalışmamıza katılan hastaların 17'sinde del17p mutasyonu bakılmıştı.

Yirmi iki hastanın del17p mutasyon durumu bilinmemekteydi. Hastaların çoğunun düşük veya orta riskli grupta olmaları nedeniyle henüz tedavi planlanmadığı için bu mutasyona henüz bakılmamış olabilir. Ancak mümkün olduğunca bu hastalarda mutasyon analizi yapılması hastalığın ilerleme bulguları fark edildiğinde hızlıca doğru tedavinin seçilmesini kolaylaştırabilir.

Çalışmamızda bir hastada bulky kitle olduğu ve bu nedenle steroid tedavisi aldığı görüldü. Ancak bu hastanın 11q22 mutasyon durumu bilinmiyordu. Del11q22-23 mutasyonu bulky lenfadenopatiler, hızlı ilerleyici hastalık, erken tedavi ihtiyacı, kısa genel sağkalımla ilişkilidir(62,63). Prognoz açısından kötü katkısı olan 11q22 mutasyonunun büyük kitlesel lezyonları olan hastalarda bakılması hastanın takibi açısından ek yarar sağlayabilir.

KLL'de hastanın fiziksel olarak iyi olup olmadığı geçmiş yıllarda tedavi kararını etkilemezken günümüzde bu açıdan da değerlendirme yapılması önerilmektedir. Son yıllarda hastaların iyilik durumlarını belirlemek için kümülatif hastalık skorlama sistemi kullanılmaya başlanmıştır(18,32). Yapılan çalışmamızda hastalarda bu açıdan yeterli veri olmadığı görüldü. Takiplerde bu bilgilerin de kaydedilmesi gerektiği düşünülmüştür.

CALR geni tarafından kodlanan CRT birçok malignite ile bağlantısı gösterilmiş hücre için önemli bir proteindir. CRT artışı özefagus kanserinde kötü prognoz, meme kanserinde artmış metastaz ve invazyon, pankreas ve mide kanserlerinde artmış lenf bezi metastazı ile ilişkilendirilmiştir. Diğer yandan artmış CRT nöroblastom için artmış sağkalımla ve over kanserlerinde kemoterapiye daha iyi yanıtla bağlantılı bulunmuştur(157). Ağız skuamoz hücreli kanserde CRT azalması durumunda hücre döngüsünün G0/G1 fazında kaldığı gösterilmiştir(149). Geniş açıdan bakıldığında hücre içinde pek çok olayda yer alan CRT'nin kanser ile bağlantısının da karmaşık olduğu düşünülebilir. Kalretikülinin ve diğer şaperonların hücre yüzeyine yerleşmesi kanser hücrelerine karşı hem doğal hem de adaptif immüniteyi artırmakta ve kemoterapiye karşı duyarlılığı artırmaktadır(115). CALR geninde mutasyon olması durumunda hücre içinde CRT yanlış yönlendirilmekte ve gerekli fonksiyonlarını yapamamakta veya eksik yapmaktadır. 2013 yılında miyeloproliferatif hastalıklar ile CALR mutasyon ilişkisi ortaya konmuştur. İzleyen yıllarda JAK2 mutasyonu olmayan hastalarda CALR mutasyonuna sık rastlandığı bildirilmiş benzer çalışmalar yayınlanmıştır. Lenfoproliferatif hastalıklar ile CRT ve CALR mutasyonu ilişkisine yönelik sınırlı sayıda

çalışma bulunmaktadır. KLL klonu taşıyan prefibrotik evrede miyelofibrosis ve primer miyelofibrosis olan iki hastada CALR mutasyonu gösterilmiştir(158). Ayrıca KLL hastalarında çözünmüş CRT miktarı ile tedavisiz izlem süresi arasında ters ilişki bulunmuştur(159).

Somatik mutasyon olarak ortaya çıkan CALR mutasyon analizleri farklı yöntemlerle yapılabilmektedir. Sekanslama yöntemi CALR mutasyonunu analiz etmede güvenilir bir yöntem olarak görülmektedir. Çoğu çalışmada doğrulama testi olarak kullanılmaktadır. Sanger sekanslama için duyarlılık %89,3 özgüllük %100 bulunmuştur(160,161). Bu açıdan bakıldığında çalışmamızdaki CALR mutasyonu negatif olan hastaların normal nükleotid sıralanması gösterdiklerini söylemek yanlış olmayacaktır.

Gelişimsel açıdan sadece hızlanmış hücre çoğalmasının değil azalmış apoptozun da KLL etyolojisinde önemli olduğu bilinmektedir. Malign KLL hücreleri G0/G1 fazında kalmışlardır. Çalışmamızda hiçbir hastada CALR mutasyonu saptanmamıştır. Bunun nedeni örneklem sayısının yeterli olmaması olabilir. Çok daha geniş hasta serilerinde daha anlamlı sonuçlara ulaşılabilir. Ayrıca KLL'de bu mutasyonun gösterilmemesi sadece CRT'nin değil ek birçok faktörün apoptozdan kaçışta söz sahibi olduğunun göstergesidir. Yine de hiçbir hastada mutasyon saptanmaması KLL hücrelerinin olgunlaşma ve farklılaşma basamaklarının ileri evrelerinde oldukları göz önüne alındığında anlamlı sayılabilir. Miyeloproliferatif hastalıklarla anlamlı ölçüde bağlantı olmasına rağmen lenfoproliferatif hastalıklarda mutasyonun negatif saptanmış olması, hücresel olarak CRT'nin farklılaşma sırasında lenfoid öncüllerin gelişiminde çok da aktif görev almaması ile ilişkili olabilir. Ya da CALR mutasyonu olması durumunda hücreler farklılaşma sırasında daha erken basamaklarda kalıyor olabilir ve KLL kadar iyi diferensiye olmayan malignitelere yol açıyor olabilir. Bu açıdan az diferensiye lenfoproliferatif hastalıklarda CALR mutasyonu çalışmaları yapılabilir. Açıklanmamış birçok görevi olan CRT için hücre içinde ve dışında yer aldığı yolaklar konusunda daha fazla bilgiye ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ

Olgun B hücrelerin malign klon olarak çoğalması sonucu ortaya çıkan ve erişkin yaşın en sık kronik lösemisi olan KLL'nin tanısında, prognostik belirteçlerinde ve tedavisi konusunda uzun zamanlardan beri sıkça çalışma yapılmaktadır. Son yıllarda özellikle tedavisi açısından olumlu gelişmeler yaşanmakta ve genellikle yavaş seyirli olduğu kabul edilen ancak ilerleyen evrelerde önemli morbidite ve mortalitesi olan bu hastalığın etyolojisini bulunmaya ve yeni tedaviler keşfedilmeye çalışılmaktadır. Eskiden daha ileri yaşlarda ortaya çıktığı düşünülen hastalığın artık daha erken evrede fark edildiği ve tanı yaşının gittikçe azaldığı görülmektedir.

Hastalıkların hem oluşumunda hem de takibinde mutasyonların önemi ve hedefe yönelik tedavilerin planlanması noktasında kullanılabilirliği bilinmektedir. Hücre için çok önemli ve çoklu işlevselliği olan kalretikülinin hala tüm görevleri tanımlanamamış olmasına rağmen pek çok malignite ile ilişkisi gösterilmiştir. CRT'yi kodlayan gen olan CALR mutasyonu ile miyeloproliferatif hastalıkları arasında bağlantı kurulmuş olup lenfoproliferatif hastalıklar ile CRT ilişkisi ve CALR gen mutasyonu ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır. Yaptığımız bu çalışmada KLL hastalarının hiçbirinde CALR exon 9 mutasyonu olmadığı gösterilmiştir. Örneklem sayısının az olmasına rağmen hiçbir hastada mutasyon olmaması lenfoid farklılaşma sırasında bu mutasyonun etkisi olmadığını düşündürebilir. Ancak geniş hasta serileri ile mutasyon taramaları yapılması literatüre büyük katkılar sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Türk Hematoloji Derneği, Kronik Lenfositik Lösemi Tanı ve Tedavi Kılavuzu, 2012.
2. Bergmann M, Wendtner CM. Chronic lymphatic leukemia. Dtsch Med Wochenschr. 2015 Apr;140(7):479-82.
3. García-Muñoz R, Galiacho VR, Llorente L. Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. Ann Hematol. 2012 Jul;91(7):981-96.
4. Goldin LR, Landgren O, Marti GE, Caporaso NE. Familial Aspects of Chronic Lymphocytic Leukemia, Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (MBL), and Related Lymphomas. European J Clin Med Oncol. 2010 Feb;2(1):119-126.
5. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2005 Feb 24;352(8):804-15.
6. Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. Nat Rev Cancer**.** 2010 Jan;10(1):37-50.
7. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, ve ark. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. Cancer Cell. 2011 Aug 16;20(2):246-59.
8. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, ve ark. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 26;99(24):15524-9.
9. Burns K, Duggan B, Atkinson E A, et al. Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. Nature. 1994;367(6462):476–480.
10. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, ve ark. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. Cell. 2005 Oct 21;123(2):321-34.
11. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan, A S, Nivarthi, H,ve ark. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. New Eng. J. Med. 369: 2379-2390, 2013.
12. Soneji S, Huang S, Loose M, Donaldson IJ, ve ark. Inference, validation, and dynamic modeling of transcription networks in multipotent hematopoietic cells. Ann N Y Acad Sci 2007; 1106: 30-40.
13. Medina K, Singh H. Genetic networks that regulate B lymphopoiesis. Current Opinion in Hematology. 2005; 12(3): 203-9.
14. Hoffman R, Benz JE Jr, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P, Heslop H. Hematology. Basic principles and practice. 5th edition. Phildelphia : Churchill Livingstone, Elsevier; 2009.

15. Küppers R, Goossens T, Klein U. The role of somatic hypermutation in the generation of deletions and duplications in human Ig V region genes and chromosomal translocations. Curr Top Microbiol Immunol**.** 1999;246:193-8.

16. Catovsky D, Müller-Hermelink HK, Montserrat E, Harris NL. B-cell prolymphocytic leukaemia. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001; 131–2.

17. Altekruze SF, Kosari CLi Krapcho M et al. eds. SEER Clinicica Statistics Rev 1975-2007. Bethesda, MD: National Cancer Insitute, 2010.

18. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. Am J Hematol. 2015 May;90(5):446-60.

19. Furman RR. Prognostic markers and stratification of chronic lymphocytic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2010: 77-81.

20. Molica S. Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. Leuk Lymphoma 2006;47:1477–1480.

21. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, et al. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992–2001. Blood 2006;107:265–276.

22. Watson L, Wyld P, Catovsky D. Disease burden of chronic lymphocytic leukemia within the European Union. Eur J Haematol 2008;81:253–258.

23. Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, et al. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: A single institution study of 204 cases. Blood 1999;94:448–454.

24. Cartwright RA, Gurney KA, Moorman AV. Sex ratios and the risks of haematological malignancies. Br J Haematol**.** 2002 Sep;118(4):1071-7.

25. Dores GM, Anderson WF, Curtis RE, Landgren O, ve ark. Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. Br J Haematol**.** 2007 Dec;139(5):809-19.

26. Goldin, L.R., Bjorkholm, M., Kristinsson, S.Y., Turesson, I. & Landgren, O. (2009) Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. Haematologica, 94,647–653.

27. Goldin LR, Slager SL, Caporaso NE. Familial chronic lymphocytic leukemia. Curr Opin Hematol. 2010; 17(4): 350-5.

28. Mauro FR, Giammartini E, Gentile M, Sperduti I, Valle V, Pizzuti A, et al. Clinical features and outcome of chronic lymphocytic leukemia. Haematologica. 2006; 91(8): 1117-20.

29. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia.Lancet. 2008 Mar 22;371(9617):1017-29.

30. Robak T. Second malignancies and Richter's syndrome in patients with chronic lymphocytic leukemia. Hematology**.** 2004 Oct-Dec;9(5-6):387-400.

31. Langerbeins P, Maurer C, Cramer P, Eichhorst B, Hallek M. Second cancers in chronic lymphocytic leukemia: growing importance in the era of improved treatment outcomes. Leuk Lymphoma**.** 2015 Jun;56(6):1575-6.

32. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, Buske C; ESMO Guidelines Committee. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2015 Sep;26 Suppl 5:v78-84. CLL trialists' collaborative group. Chemotherapeutic options in chronic lymhocytic leukemia. J Natl Cancer Inst 1999*;*91*:*861–868.

33. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, *et al.* Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. British Journal of Haematology 2005*;*130*:*325–332.

34. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, *et al.* Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). Am J Clin Pathol 1997*;*108*:*378–382.

35. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, *et al.* Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. J Clin Pathol 1998*;*51*:*364–369.

36. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. 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 2008;111:5446–5456.

37. Rai KR. A critical analysis of staging in CLL. *In:* Gale RP, Rai KR, editors. Chronic Lymphocytic Leukemia: Recent Progress and Future Directions. New York*:* Alan R. Liss; 1987. pp 253–264.

38. Binet JL, Auguier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer. 1981:198-206.

39. Borche L, Lim A, Binet JL, Dighiero G Evidence that chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes are frequently committed to production of natural autoantibodies. Blood 1990; 76(3): 562-9.

40. Widhopf GF 2nd, Rassenti LZ, Toy TL, Gribben JG, Wierda WG, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than %1 o patients express virtually identical immunoglobulins. Blood. 2004; 104(8): 2499-504.

41. Rego N, Bianchi S, Moreno P, Persson H, Kvist A, Pena A, et al. Search for an aetiological virus candidate in chronic lymphocytic leukemia by extensive transcriptome analysis. Br J Haematol. 2012; 157(6): 709-17.

42. Hermouet S, Sutton CA, Rose TM, Greenblatt RJ, Corre I, Garand R, et al. Qualitative and quantitative analysis of human herpesviruses in chronic and acute B cell lymphocytic leukemia and in multiple myeloma. Leukemia 2003; 17(1): 185– 195.

43. Dühren von Minden M, Übelhart R, Schneider D, Wossning T, Bach MP, Buchner M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen- independent cell-autonomous signalling. Nature 2012; 489(7415): 309-12.

44. Wickremasinghe RG, Prentice AG, Steele AJ. Aberrantly activated anti- apoptotic signalling mechanisms in chronic lymphocytic leukaemia cells: clues to the identification of novel therapeutic targets. Br J Haematol. 2011; 153(5): 545-56.

45. Calissano C, Damle RN, Hayes G, Murphy EJ, Hellerstein MK, Moreno C, Sison C, Kaufman MS, Kolitz JE, Allen SL, Rai KR, Chiorazzi N. In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood**.** 2009 Nov 26;114(23):4832-42.

46. Kokhaei P, Palma M, Mellstedt H, Choudry A. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia.Ann Oncol .2005; 16 (Suppl 2): 113-23.

47. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, Faderl S, Ferrajoli A, Do KA, et al. Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. Blood 2007; 109: 4679–85.

48. Lee JS, Dixon DO, Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. Blood**.** 1987 Mar;69(3):929-36.

49. Bottcher S, Ritgen M, Fischer K, et al. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: A multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. J Clin Oncol 2012;30:980–988.

50. Seiler T, Döhner H, Stilgenbauer S. Risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. Semin Oncol 2006; 33(2): 186–94.

51. Yegin ZA, Ozkurt ZN, Yağci M. Free light chain: a novel predictor of adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia. Eur J Haematol. 2010; 84(5): 406-11.

52. Pratt G, Harding S, Holder R, Fegan C, ve ark. Abnormal serum free light chain ratios are associated with poor survival and may reflect biological subgroups in patients with chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol. 2009; 144(2): 217-22.

53. Chiorazzi N. Implication of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2012: 76-87.

54. Shanafelt TD. Predicting clinical outcome in CLL: how and why. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009:421-9.

55. Zenz T, Mertens D, Döhner H, Stilgenbauer S. Molecular diagnostics in chronic lymphocytic leukemia - pathogenetic and clinical implications. Leuk Lymphoma**.** 2008 May;49(5):864-73.

56. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV ve ark. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Sep 27;102(39):13944-9.

57. Klein U, Lia M, Crespo M, *et al.* The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. Cancer Cell 2010;17:28–40.

58. Seiffert M, Dietrich S, Jethwa A, *et al.* Exploiting biological diversity and genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma 2012;53:1023–1031.

59. Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, ve ark. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. Blood. 1995 Mar 15;85(6):1580-9.

60. Zenz T, Mertens D, Döhner H, Stilgenbauer S. Importance of genetics in chronic lymphocytic leukemia. Blood Rev. 2011 May;25(3):131-7.

61. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: A randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet 2010;376:1164–1174.

62. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, ve ark. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2000 Dec 28;343(26):1910-6.

63. Stilgenbauer S. Dohner H. Campath-1H-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy. N Engl J Med 2002;347:452–453.

64. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood**.** 1999 Sep 15;94(6):1848-54.

65. Zens T, Fröhling S, Mertens D, Döhner H, Stilgenbauer S. Moving from prognostic to predictive factors in chronic lymphcytic leukaema Best Practice and Research Clinical Haematoloji 2010; 23(1): 71-84

66. Malavasi F, Deaglio S, Damle R, Cutrona G, Ferrarini M,Chiorazzi N. CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. Blood 2011; 118: 3470-8.

67. Del Principe DI, Del Poeta G, Buccisano F, Maurillo L, Venditti A, Zucchetto A. Clinical significans of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood 2006; 108: 853-61.

68. Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. Nat Genet 2011;44:47–52., Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. Nature 2011;475:101–105.

69. CLL trialists' collaborative group. Chemotherapeutic options in chronic lymhocytic leukemia. J Natl Cancer Inst 1999;91:861–868.

70. Dighiero G, Maloum K, Desablens B, et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 1998;338:1506–1514.

71. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. Leukemia 2007;21:956–964.

72. Moreton P, Kennedy B, Lucas G, et al. Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. J Clin Oncol 2005;23:2971–2979.

73. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 2000;343:1750–1757.

74. Steurer M, Pall G, Richards S, et al. Purine antagonists for chronic lymphocytic leukaemia. Cochrane Database Syst Rev 2006;3:CD004270.

75. Robak T, Blonski JZ, Kasznicki M, et al. Cladribine with prednisone versus chlorambucil with prednisone as first-line therapy in chronic lymphocytic leukemia: Report of a prospective, randomized, multicenter trial. Blood 2000;96:2723–2729.

76. Knauf WU, Lissichkov T, Aldaoud A, et al. Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol 2009; 27:4378–4384.

77. Hagemeister F. Rituximab for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. Drugs 2010;70:261–272.

78. Wierda WG, Kipps TJ, Mayer J, et al. Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol 2010;28:1749–1755.

79. Patz M, Isaeva P, Forcob N, et al. Comparison of the in vitro effects of the anti-CD20 antibodies rituximab and GA101 on chronic lymphocytic leukaemia cells. Br J Haematol 2011;152:295–306.

80. Lozanski G, Heerema NA, Flinn IW, et al. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. Blood 2004;103:3278–328.

81. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, et al. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2011;118:4313–4320.

82. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. J Clin Oncol. 2013 Jan 1;31(1):88-94.

83. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 2013;369:32–42.

84. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, et al. Inhibition of constitutive and BCR-induced syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. Leukemia 2009;23:686–697.

85. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, et al. Inhibition of syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. Blood 2010;115:2578–2585.

86. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2011;118:3603–3612.

87. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110delta, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. Blood 2014;123:3390–3397.

88. Veldurthy A, Patz M, Hagist S, et al. The kinase inhibitor dasatinib induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro with preference for a subgroup of patients with unmutated IgVH genes. Blood 2008;112:1443–1452.

89. Castro JE, Loria OJ, Aguillon RA, et al. A phase II, open label study of at-101 in combination with rituximab in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. Evaluation of two dose regimens. ASH Annual Meeting Abstracts 2007;110:3119.

90. Seymour JF, Davids MS, Pagel JM, et al. ABT-199 (GDC-0199) in relapsed/refractory (R/R) chronic lymphocytic leukemia (CLL) and small lymphocytic lymphoma (SLL): High complete- response rate and durable disease control. J Clin Oncol 2014;32:abstract 7015.

91. Ferrajoli A, Lee BN, Schlette EJ, et al. Lenalidomide induces complete and partial remissions in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. Blood 2008;111:5291–5297.

92. Chanan-Khan A, Miller KC, Musial L, et al. Clinical efficacy of lenalidomide in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: Results of a phase II study. J Clin Oncol 2006;24:5343–5349.

93. Chanan-Khan AA, Czuczman MS, Padmanabhan S, et al. Clinical efficacy of lenalidomide in Fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia patients. ASH Annual Meeting Abstracts 2007;110:3108.

94. Badoux XC, Keating MJ, Wen S, et al. Phase II study of lenalidomide and rituximab as salvage therapy for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol 2013;31:584–591.

95. Brown JR, Abramson J, Hochberg E, et al. A phase I study of lenalidomide in combination with fludarabine and rituximab in previously untreated CLL/SLL.

Leukemia 2010;24:1972–1975.

96. Zent CS, LaPlant BR, Johnston PB, et al. The treatment of recurrent/refractory chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL) with everolimus results in clinical responses and mobilization of CLL cells into the circulation. Cancer 2010;116:2201–2207.

97. Hallek M, Eichhorst BF. Chemotherapy combination treatment regimens with fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. Hematol J 2004;5:S20–S30.

98. Catovsky D, Richards S, Matutes E, et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 trial): A randomised controlled trial. Lancet 2007;370:230–239.

99. Robak T, Blonski JZ, Gora-Tybor J, et al. Cladribine alone and in combination with cyclophosphamide or cyclophosphamide plus mitoxantrone in the treatment of progressive chronic lymphocytic leukemia: Report of a prospective, multicenter, randomized trial of the polish adult leukemia group (PALG CLL2). Blood 2006;108:473–479.

100. Byrd JC, Peterson BL, Morrison VA, et al. Randomized phase 2 study of fludarabine with concurrent versus sequential treatment with rituximab in symptomatic, untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: Results from cancer and leukemia group B 9712 (CALGB 9712). Blood 2003;101:6–14.

101. Parikh SA, Keating MJ, O'Brien S, et al. Frontline chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, alemtuzumab, and rituximab for high-risk chronic lymphocytic leukemia. Blood 2011;118:2062–2068.

102. Bosch F, Abrisqueta P, Villamor N, et al. Rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone: A new, highly active chemoimmunotherapy regimen for chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol 2009;27:4578–4584.

103. Reynolds C, Di Bella N, Lyons RM, et al. A phase III trial of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab vs. Pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Invest New Drugs 2012;30:1232–1240.

104. Fischer K, Cramer P, Busch R, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: A multicenter phase II trial of the german chronic lymphocytic leukemia study group. J Clin Oncol 2012;30:3209–3216.

105. Fischer K, Cramer P, Busch R, et al. Bendamustine combined with rituximab in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukemia: A multicenter phase II trial of the german chronic lymphocytic leukemia study group. J Clin Oncol 2011;29:3559–3566.

106. Eichhorst B, Fink AM,, Busch R,, et al. Frontline chemoimmunotherapy with fludarabine (F), cyclophosphamide (C), and rituximab (R) (FCR) shows superior efficacy in comparison to bendamustine (B) and rituximab (BR) in previously untreated and physically fit patients (pts) with advanced chronic lymphocytic

leukemia (CLL): Final analysis of an international, randomized study of the german CLL study group (GCLLSG) (CLL10 study). Blood 2014;124:abstract 19.

107. Goede V, Fischer K, Busch R, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. N Engl J Med 2014;370:1101–1110.

108. Hillmen P, Robak T, Janssens A, et al. Ofatumumab + Chlorambucil Versus Chlorambucil Alone In Patients With Untreated Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Results Of The Phase III Study Complement 1 (OMB110911). Blood 2013;122:528.

109. Elter T, Borchmann P, Schulz H, et al. Fludarabine in combination with alemtuzumab is effective and feasible in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: Results of a phase II trial. J Clin Oncol 2005;23:7024–7031.

110. Lepretre S, Aurran T, Mahe B, et al. Excess mortality after treatment with fludarabine and cyclophosphamide in combination with alemtuzumab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia in a randomized phase 3 trial. Blood 2012;119:5104–5110.

111. Elter T, Gercheva-Kyuchukova L, Pylylpenko H, et al. Fludarabine plus alemtuzumab versus fludarabine alone in patients with previously treated chronic lymphocytic leukaemia: A randomised phase 3 trial. Lancet Oncol 2011;12:1204–1213.

112. O'Brien S, Moore JO, Boyd TE, Larratt LM, Skotnicki AB, Koziner B, Chanan-Khan AA, Seymour JF, Gribben J, Itri LM, Rai KR. 5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen. J Clin Oncol. 2009 Nov 1;27(31):5208-12.

113. Dreger P, Schetelig J, Andersen N, et al. Managing high-risk CLL during transition to a new treatment era: Stem cell transplantation or novel agents? Blood 2014;124:3841–3849.

114. Bedard K, Szabo E, Michalak M, Opas M. Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. Int Rev Cytol. 2005;245:91-121.

115. Gold L, Williams D, Groenendyk J, Michalak M, Eggleton P. (Unfolding the complexities of ER chaperones in health and disease: report on the 11th international calreticulin workshop. Cell Stress Chaperones. 2015 Nov;20(6):875-83.

116. Wang WA, Groenendyk J, Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease. Int J Biochem Cell Biol. 2012 Jun;44(6):842-6.

117. Michalak M., Parker J. M. R., Opas M. Ca^{2+} signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. Cell Calcium. 2002;32(5-6):269–278.

118. Rojiani M. V. In vitro interaction of a polypeptide homologous to human Ro/SS-A antigen (Calreticulin) with a highly conserved amino acid sequence in the cytoplasmic domain of integrin α subunits. Biochemistry. 1991;30(41):9859–9866.

119. Frickel E. M., Riek R., Jelesarov I., Helenius A., Wüthrich K., Ellgaard L. (2002) TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *99*:*1954–1959.*

120. Pollock S., Kozlov, G., Pelletier, M. F., Trempe, J.F., Jansen, G., Sitnikov, D., Bergeron,J. J., Gehring, K., Ekiel, I. And Thomas, D. Y.(2004) Specific interaction of ERp57 and calnexin determined by NMR spectroscopy and an ER two-hybrid system. EMBO J. 23,1020-1029.

121. Baksh S., Michalak M. Expression of calreticulin in Escherichia-coli and identification of its Ca2+ binding domains. The Journal of Biological Chemistry. 1991;266(32):21458–21465.

122. Tjoelker L. W., Seyfried C. E., Eddy R. L., Jr., et al. Human, mouse, and rat calnexin cDNA cloning: identification of potential calcium binding motifs and gene localization to human chromosome 5. Biochemistry. 1994;33(11):3229–3236.

123. Nakamura K., Zuppini A., Arnaudeau S., et al. Functional specialization of calreticulin domains. The Journal of Cell Biology. 2001;154(5):961–972.

124. Nguyen T. Q., Capra J. D., Sontheimer R. D. Calreticulin is transcriptionally upregulated by heat shock, calcium and heavy metals. Molecular Immunology. 1996;33(4-5):379–386.

125. Bibi A., Agarwal N. K., Dihazi G. H., et al. Calreticulin is crucial for calcium homeostasis mediated adaptation and survival of thick ascending limb of Henle's loop cells under osmotic stress. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2011;43(8):1187–1197.

126. Hebert D. N., Maurizio M. In and Out of the ER: Protein Folding, Quality Control, Degradation, and Related Human Diseases 2007; Phisiol. Rev. Vol. 87 no. 4, 1377-1408.

127. Dedhar S., Rennie P. S., Shago M., et al. Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin. Nature. 1994;367(6462):480–483.

128. Szabo E., Qiu Y., Baksh S., Michalak M., Opas M. Calreticulin inhibits commitment to adipocyte differentiation. The Journal of Cell Biology. 2008;182(1):103–116.

129. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum.Biochem J. 2009 Feb 1;417(3):651-66.

130. Nanney LB, Woodrell CD, Greives MR, Cardwell NL, Pollins AC, Bancroft TA, Chesser A, Michalak M, Rahman M, Siebert JW, Gold LI. Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects. Am J Pathol. 2008 Sep;173(3):610-30.

131. Dedhar S. Novel functions for calreticulin: interaction with integrins and modulation of gene expression? Trends Biochem Sci. 1994 Jul;19(7):269-71.

132. Leung-Hagesteijn CY, Milankov K, Michalak M, Wilkins J, Dedhar S. Cell attachment to extracellular matrix substrates is inhibited upon downregulation of expression of calreticulin, an intracellular integrin alpha-subunit-binding protein. J Cell Sci. 1994 Mar;107 (Pt 3):589-600.

133. Nickenig G, Michaelsen F, Müller C, Berger A, Vogel T, Sachinidis A, Vetter H, Böhm M. Destabilization of AT(1) receptor mRNA by calreticulin. Circ Res. 2002 Jan 11;90(1):53-8.

134. Totary-Jain H., Naveh-Many T., Riahi Y., Kaiser N., Eckel J., Sasson S. Calreticulin destabilizes glucose transporter-1 mRNA in vascular endothelial and smooth muscle cells under high-glucose conditions. Circulation Research. 2005;97(10):1001–1008.

135. Li J, Pucéat M, Perez-Terzic C, Mery A, Nakamura K, Michalak M, Krause KH, Jaconi ME. Calreticulin reveals a critical Ca(2+) checkpoint in cardiac myofibrillogenesis. J Cell Biol**.** 2002 Jul 8;158(1):103-13.

136. Kishore U., Sontheimer R. D., Sastry K. N., Zappi E. G., ve ark. *(*1997) The systemic lupus erythematosus (SLE) disease autoantigen-calreticulin can inhibit C1q association with immune complexes. Clin. Exp. Immunol. 108*:*181–190.

137. Eggleton P, Lieu TS, Zappi EG, Sastry K, ve ark. Calreticulin is released from activated neutrophils and binds to C1q and mannan-binding protein. Clin Immunol Immunopathol. 1994 Sep;72(3):405-9

138. Arosa FA, de Jesus O, Porto G, Carmo AM, de Sousa M. Calreticulin is expressed on the cell surface of activated human peripheral blood T lymphocytes in association with major histocompatibility complex class I molecules. J Biol Chem. 1999 Jun 11;274(24):16917-22.

139. Chaput N, De Botton S, Obeid M, Apetoh L, Ghiringhelli F, Panaretakis T, Flament C, Zitvogel L, Kroemer G. Molecular determinants of immunogenic cell death: surface exposure of calreticulin makes the difference. J Mol Med (Berl). 2007 Oct;85(10):1069-76.

140. Sipione S, Ewen C, Shostak I, Michalak M, Bleackley RC.Impaired cytolytic activity in calreticulin-deficient CTLs. J Immunol. 2005 Mar 15;174(6):3212-9.

141. Wang HT, Lee HI, Guo JH, Chen SH, Liao ZK, Huang KW, Torng PL, Hwang LH. Calreticulin promotes tumor lymphocyte infiltration and enhances the antitumor effects of immunotherapy by up-regulating the endothelial expression of adhesion molecules. . Int J Cancer. 2012 Jun 15;130(12):2892-902.

142. Clarke C, Smyth MJ. Calreticulin exposure increases cancer immunogenicity. Nat Biotechnol. 2007 Feb;25(2):192-3.

143. Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, Alizadeh AA, Gentles AJ, Volkmer J, Weiskopf K, Willingham SB, Raveh T, Park CY, Majeti R, Weissman IL.

Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. Sci Transl Med. 2010 Dec 22;2(63):63ra94.

144. Wemeau M, Kepp O, Tesnière A, Panaretakis T, Flament C, De Botton S, Zitvogel L, Kroemer G, Chaput N. Calreticulin exposure on malignant blasts predicts a cellular anticancer immune response in patients with acute myeloid leukemia. Cell Death Dis. 2010 Dec 2;1:e104.

145. Fucikova J, Kralikova P, Fialova A, Brtnicky T, Rob L, Bartunkova J, Spísek R. Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. Cancer Res. 2011 Jul 15;71(14):4821-33.

146. Chen CN, Chang CC, Su TE, Hsu WM, Jeng YM, Ho MC, Hsieh FJ, Lee PH, Kuo ML, Lee H, Chang KJ. Identification of calreticulin as a prognosis marker and angiogenic regulator in human gastric cancer. Ann Surg Oncol. 2009 Feb;16(2):524-33.

147. Lwin ZM, Guo C, Salim A, Yip GW, Chew FT, Nan J, Thike AA, Tan PH, Bay BH. Clinicopathological significance of calreticulin in breast invasive ductal carcinoma. Mod Pathol. 2010 Dec;23(12):1559-66.

148. Kageyama S, Isono T, Matsuda S, Ushio Y, Satomura S, Terai A, Arai Y, Kawakita M, Okada Y, Yoshiki T. Urinary calreticulin in the diagnosis of bladder urothelial carcinoma. Int J Urol. 2009 May;16(5):481-6.

149. Chiang WF, Hwang TZ, Hour TC, Wang LH, et al. Calreticulin, an endoplasmic reticulum-resident protein, is highly expressed and essential for cell proliferation and migration in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2013 Jun;49(6):534-41.

150. Hsu WM, Hsieh FJ, Jeng YM, Kuo ML, et al. Calreticulin expression in neuroblastoma--a novel independent prognostic factor. Ann Oncol. 2005 Feb;16(2):314-21.

151. McCauliffe, D. P., Lux, F. A., Lieu, T.-S., Sanz, I., et al. Molecular cloning, expression, and chromosome 19 localization of a human Ro/SS-A autoantigen. J. Clin. Invest. 85: 1379-1391, 1990.

152. Persson, S., Rosenquist, M., Sommarin, M. Identification of a novel calreticulin isoform (Crt2) in human and mouse. Gene 297: 151-158, 2002.

153. Nangalia J, et al.Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. N Engl J Med. 2013 Dec 19;369(25):2391-405.

154. Patnaik MM, Tefferi A. Refractory anemia with ring sideroblasts and RARS with thrombocytosis. Am J Hematol. 2015 Jun;90(6):549-59.

155. He R, Hanson CA, Chen D, Oliveira JL, Pardanani A, Reichard KK, Viswanatha DS. Not all CALR mutations are created equal. Leuk Lymphoma. 2015;56(8):2482-3.

156. Raanani P, Gafter-Gvili A, Paul M, Ben-Bassat I, Leibovici L, Shpilberg O. Immunoglobulin prophylaxis in chronic lymphocytic leukemia and multiple

myeloma: systematic review and meta-analysis. Leuk Lymphoma. 2009 May;50(5):764-72.

157. Lu YC, Weng WC, Lee H. Functional roles of calreticulin in cancer biology. Biomed Res Int. 2015;2015:526524.

158. Salama ME, Swierczek SI, Tashi T, Warby CA, Reading NS, Prchal JT. Calreticulin mutated prefibrotic-stage myelofibrosis and PMF represent an independent clone from coexisting CLL. Blood. 2014 Sep 4;124(10):1691-2.

159. Molica S, Digiesi G, D'Arena G, Mirabelli R, Antenucci A, Conti L, Gentile M, Musto P, Neri A, Morabito F. Serum levels of soluble calreticulin predict for time to first treatment in early chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol. 2016 Jan 5.

160. Jones AV, Ward D, Lyon M, Leung W, et al.Evaluation of methods to detect CALR mutations in myeloproliferative neoplasms. Leuk Res. 2015 Jan;39(1):82-7.

161. Park JH, Sevin M, Ramla S, Truffot A, et al. Calreticulin Mutations in Myeloproliferative Neoplasms: Comparison of Three Methods. PLoS One 2015. Oct 26;10(10):e0141010.

ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

***(Hekimin Açıklaması)*.**

Dokuz Eylül Üniversitesi Hematoloji Bilim Dalı'nda Kronik lenfositer lösemi (KLL) nedeni ile gerektiği anda tedavi edilmek üzere izlenmektesiniz. Kronik lenfositer lösemi vücudumuzun savunma hücreleri akyuvarların bir alt tipi olan lenfositlerden kaynaklanan kan ve kemik iliği kanseri türüdür. En sık görülen kronik lösemi tipidir. Lenfosit adı verilen tek bir hücre kanser hücresine dönüşüp, zamanla çoğalarak kemik iliğinde ve lenf düğümlerinde normal lenfositlerin yerini alırlar.

KLL tanılı hastalarda bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi ***TEDAVİ ALMAMIŞ KRONİK LENFOSİTER LÖSEMİ (KLL) HASTALARINDA KALRETİKÜLİN GEN (CALR) MUTASYON SIKLIĞI***'dır. Çalışma yaklaşık olarak 30 hastanın katılımı ile yapılacaktır

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuduktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Bu çalışmada sizin gibi takip edilen ve hastalığına yönelik herhangi bir ilaç tedavisi almamış KLL hastalarında hücresel çoğalmayı etkilediği düşünülen bir protein ile ilgili genetik özellikleri ortaya koymak için sizden sadece bir kan testi yapılacaktır. İzniniz doğrultusunda rutin laboratuar tetkikleri için verdiğiniz kan örneğine ek olarak 1 tüp (4 cc) kan almamız gerekmektedir. Size ek olarak herhangi bir girişimsel işlem yapılmayacak, işlem sırasında ek bir acı duymayacaksınız.

Yapılacak çalışmada hastalığınız ile bu mutasyon arasında ilişki olup olmadığı ile ilgili veri elde edilecektir. İsteğiniz halinde sonuçlar ile ilgili bilgilendirileceksiniz. Tüm genetik haritanız çıkarılmayacak ve elde edilen bilgi üçüncü şahıslara sizin onayınız olmaksızın açıklanmayacak ve gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır. Araştırma sonucunda elde edilecek bilgilerin yayınlanması durumunda kimlik bilgileriniz açıklanmayacaktır.

Elde edilen kan ürünü laboratuarda çalışıldıktan sonra imha edilecek, başka çalışmalarda kullanılmayacaktır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır. Bağlı olduğunuz sosyal güvenlik kurumundan da bir ödeme istenmeyecektir. Tüm çalışma masrafları araştırma ile ilgili bütçeden karşılanacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Sayın Dr. Ayşe Daylan veya Prof. Dr. Mehmet Ali Özcan tarafından Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" 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 bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim)* Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı 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. Ayşe Daylan veya Prof. Dr. Mehmet Ali Özcan 02324124848, 02324124875 no'lu telefonlardan veya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı adresinden 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" olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı	**Görüşme tanığı**
Adı, soyadı:	Adı, soyadı:
Adres:	Adres:
Tel:	Tel:
Tarih:	Tarih:
İmza:	İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

Tarih:

İmza: