

# Kronik Lenfositik Lösemi Olgularında ZAP-70 (Zeta-Associated Protein 70 KD) ile Diğer Prognostik Belirteçlerin Akım Sitometrik Analizi ve Karşılaştırılması

## The Flow Cytometric Analysis of ZAP-70 (Zeta-Associated Protein 70 KD) and the Others Prognostic Markers for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia

Selami Koçak TOPRAK<sup>1</sup>(ID), Klara DALVA<sup>1</sup>(ID), Muhit ÖZCAN<sup>1</sup>(ID)

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

### ÖZ

**Amaç:** Kronik lenfositik lösemi (KLL), en sık görülen B lenfoproliferatif hastalık olmakla birlikte fizyopatolojik ve onkojenik yolağı oldukça karmaşık ve heterojendir. Bazı olgularda hızla ileri evrelere geçiş izlenirken, bazılarında hastalık progresyonu olmadan, uzun süren bir sağkalıma rastlanmaktadır. Bu da hastalığın prognostik belirleyicilerinin saptanmasının önemini bir kat daha arttırmaktadır.

**Hastalar ve Yöntem:** Her olguya ait periferik kan örneklerinde akım sitometrik olarak ZAP-70, CD38 ve fosforile-ZAP-70 ekspresyonu ile birlikte çeşitli biyokimyasal belirteçler çalışıldı ve bunların evre ve tedavi gereksinmesi gibi başka parametrelerle ilişkisi analiz edildi.

**Bulgular:** Tanı sırasında ileri evre olma durumu ile yakınma varlığı ve tedavi gereksinmesi ilişkili bulunurken, ZAP-70 ve CD38 ekspresyonlarından farklı olarak sadece fosforile-ZAP-70 ekspresyonu ileri evrede anlamlı yüksek bulunmuştur. ZAP-70 ekspresyonu tanı sırasında hastalardaki yakınma varlığı ile ilişkili iken, tanı sırasında tedavi gerekmeyen hastalarda uzun dönemde ortaya çıkabilecek tedavi gereksinmesinin de anlamlı bir belirleyicisi gibi durmaktadır.

**Sonuç:** ZAP-70 ekspresyonunun ve dahası fosforile-ZAP-70 ekspresyonunun, hedefe yönelik tedavilerin yaygınlaştığı günümüzde prospektif çalışmalarda, tedavi gereksinmesini, tedaviyi kesme kararını ve nihayetinde de sağkalımı öngörmeye önemli bir belirteç olarak kullanılmaya devam edileceği aşikardır.

**Anahtar Kelimeler:** Kronik lenfositik lösemi; Zeta-associated protein 70 KD, ZAP-70; Prognostik belirteçler

### ABSTRACT

**Objective:** Although chronic lymphocytic leukemia (CLL) is one of the most prevalent hematological malignancies, the oncogenic pathway is poorly understood. The clinical course of CLL is heterogeneous: many patients have indolent disease that never needs treatment, but others have an aggressive clinical outcome. Although staging systems still dictate management, it is not always possible to predict within early-stage CLL, which comprises approximately 50% of diagnosis, those patients who are likely to progress and those who will remain with stable disease for decades.

**Makale atfı:** Toprak SK, Dalva K, Özcan M. Kronik lenfositik lösemi olgularında ZAP-70 (zeta-associated protein 70 KD) ile diğer prognostik belirteçlerin akım sitometrik analizi ve karşılaştırılması. LLM Dergi 2019;3(4):76-84.

### Yazışma Adresi

Doç. Dr. Selami Koçak TOPRAK

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Hematoloji Bilim Dalı,  
Ankara-Türkiye

Geliş: 30.12.2019 - Kabul: 10.01.2020

E-posta: sktoprak@yahoo.com

**Patients and Methods:** We analyzed ZAP-70, CD38, and phosphorylated ZAP-70 expressions in CLL cells from a series of patients using flow cytometry and correlated the results with the other clinical features like disease stage.

**Results:** While the being in advanced stage and the presence of symptoms and the need for treatment at the time of diagnosis were correlated, only phosphorylated ZAP-70 expression was found to be significantly higher in the advanced stage, unlike ZAP-70 and CD38 expressions. While ZAP-70 expression is associated with the presence of complaints in the patients at the time of diagnosis, it seems to be a significant determinant of the long-term need for treatment in patients who do not require treatment at the time of diagnosis.

**Conclusion:** It is clear that the expression of ZAP-70 and, moreover, phosphorylated ZAP-70 expression will continue to be used as an important marker for predicting treatment need, decision to discontinue treatment and ultimately survival in prospective studies.

**Key Words:** Chronic lymphocytic leukemia; Zeta-associated protein 70 KD, ZAP-70; Prognostic markers

## GİRİŞ

Kronik lenfositler lösemi (KLL)'nin klinik seyri oldukça heterojendir. Genellikle pek çok hasta "indolent" bir seyir gösterip herhangi bir tedaviye gereksinme duymazken, bazı hastaların oldukça saldırgan bir hastalık seyri ve akibetine sahip oldukları bilinmektedir (1). Tanı sırasında, hastalık gidişatı hakkında öngöründe bulunmanın zorluğu ve dahası erkenden tedavi başlamanın klinik akıbete olumlu yönde etkisinin net olarak ortaya koyulamaması nedeniyle, günümüzde KLL tedavisi ancak semptomatik, progresif ya da her ikisini birden taşıyan hastalara önerilmektedir (2). Yapılan çalışmalarda, KLL hücrelerinin ister erken isterse ileri evre (Binet ya da Rai) olsun sahip oldukları bazı özelliklerin genellikle "saldırgan/kötü" bir klinik gidişe işaret ettikleri bilinmektedir. İmmünglobulin ağır zincir genindeki değişken bölgenin ( $IgV_H$  gen) somatik mutasyona sahip olmaması, *del* (11q23), p53 genindeki kayıp ya da mutasyon, CD38 aşırı ekspresyonu, timidin kinaz gibi bazı serum belirteçlerinin konsantrasyonlarının beklenenden yüksek olması ve kompleks sitogenetik anomaliler, bunlar arasında ilk sırada sayılabilecek özelliklerdir (3,4). Çok değişkenli (multivariate) analizlerde ise,  $IgV_H$  genin mutasyona sahip olmamasının (unmutated olması), o hastada klinik gidişin "kötü" olacağını öngörmede en güçlü ve en güvenilir özellik olduğu kanıtlanmıştır (1,5). Ancak her kötü/saldırgan seyirli hastanın da "unmutated"  $IgV_H$  gene sahip olmadığı bilinmektedir (2). Dahası immünglobulin ağır zincir genindeki değişken bölgenin somatik mutasyona sahip olup olmadığının belirlenmesi, halihazırda kolay, ucuz, pratik ve güçlü bir şekilde standardize edilebilmiş bir süreç değildir, bu nedenle dünya çapında da yaygınlaşmamıştır (1,2).

$IgV_H$  geninde mutasyon olan ya da olmayan KLL gruplarının gen ekspresyon paternlerinin, DNA "microarray" ile yapılan profillemeye çalışmalarının nihayetinde benzer oldukları saptanmıştır (6,7). Bu iki benzer grup arasındaki farklılıkları oluşturan az sayıda genlerden birisi de, T hücre reseptör sinyal yolağında kritik bir role sahip olup, intraselüler tirozin kinazlardan bir tanesi olan "70-kD zeta-chain-associated protein (ZAP-70)"i kodlayan bir genidir. Bazı çalışmaların sonunda, ZAP-70 aşırı ekspresyonunun kötü klinik seyirle alakalı olup  $IgV_H$  gen mutasyonel durumu ile

korelasyon göstermediği belirtilirken, bazı geniş hasta katılımlı çalışmalarda ZAP-70 ekspresyonunun özellikle "unmutated"  $IgV_H$  gene sahip hastalarda kat be kat daha fazla olduğu saptanmıştır (1,2,8).

Yakın zamanda, bazı çalışmalardaki ZAP-70'in fosforile durumunun hastalık aktivasyonu ile ilişkisi olabileceği hipotezinden hareketle kronik ve akut lösemilerde etyopatogenezi fosforile-ZAP-70'in rolünün olup olmadığı konusu ilgi çekmektedir (9).

Bu noktadan hareketle biz de, KLL hastalarımızda, ZAP-70 ve fosforile-ZAP-70 ekspresyonunun akım sitometrik analizini yapmayı ve bunun KLL'ye özgü diğer akım sitometrik belirteçler ile klinik ve biyokimyasal özelliklerle ilişkisini irdelemeyi amaçladık.

## HASTALAR ve YÖNTEM

### Hastalar ve Örneklemeler

Fakültemiz bilim dalı polikliniğine başvuran ardışık 35 KLL hastası bu çalışmaya dahil edildi. Çalışmamız, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 27 Mart 2006 tarih ve 89-2321 sayı ile onay aldı.

Tüm hastalarda KLL tanısı için, klinik, morfolojik ve immünofenotipik özelliklerin yanı sıra Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) ve Uluslararası KLL Çalışma Grubu (iwCLL)'nin ölçütleri esas alındı (10,11).

### Prosedür

Tüm olgularda etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere alınan periferik venöz kan örneklerinden yapılmış olan akım sitometrik analizler incelendi.

Klinik fizik muayene tarafımızca yapıldı ve not edildi. Biyokimyasal parametrelerden ise laktat dehidrogenaz (LDH), ürik asit (ÜA), C-reaktif protein (CRP) ve beta-2 mikroglobulin biyokimya tüpüne alınan 5 mL venöz kan örneğinde irdelendi (10-13).

### Akım Sitometrik Tetkik

Her olguya ait periferik kan örneğindeki ZAP-70 ekspresyonu tayini için, gerek hücre fiksasyon-permeabilizasyon gerekse antikor uygulaması ilk 24 saat içinde gerçek-

leştirildi. Çalışma için EDTA'lı kan örnekleri,  $1 \times 10^6$  lökosit/tüp konsantrasyonlarında olacak şekilde kullanıldı. Örneklerde ZAP-70 dışındaki tüm işaretler, hücre yüzeyinde belirlenirken; ZAP-70 ifadesi hücre zarı geçirgen hale getirilen hücrelerin içinde ölçüldü.

**a. Hücre yüzey antijenlerinin saptanması:** Çevre kan örneğindeki lökositlerde antijen ifadelerinin belirlenmesi için CD45/CD14/HLA-DR, CD19/CD5/CD2, CD23/CD38/CD20, IgG1<sub>FITC</sub>/IgG1<sub>PE</sub>/IgG1<sub>PC5</sub> (Immunotech, Marseille, France) şeklinde üçlü paneller oluşturularak KLL hücrelerinin fenotipik özellikleri değerlendirildi. Çalışmadaki tüm veriler akım sitometri cihazında (FC500, Beckman Coulter, Miami, USA) toplanmakta ve toplanan sinyaller (10.000 lökosit/tüp) daha sonra analiz edilmek üzere hafızaya kaydedilmektedir.

#### **b. Sitoplazmik ZAP-70 ifadesinin değerlendirilmesi:**

Bu amaçla kullanılan malzeme ve yöntem şu şekildedir: Anti-ZAP-70 (clone: SBZAP) (CELLLAB, Beckman Coulter, Fullerton, CA). Anti-CD2<sub>PC5</sub>, Anti CD19<sub>PE</sub>, Sheat Fluid (EDTA içeren PBS, kullanıma hazır olarak temin edilir, Beckman Coulter, Miami, USA). Intraprep I ve Intraprep II (Immunotech, Marseille, France).

100 µL çevre kanının üzerine 10'ar µL anti-CD2<sub>PC5</sub> ve anti-CD19<sub>PE</sub> eklenip pipetlemlenerek 20 dakika oda ısısında karanlıkta bekletilmektedir. Tüpe 50 µL Intraprep II reaktif eklenerek 5 dakika oda ısısında ve ardından tüplere anti-ZAP-70 antikorundan 3 mL eklenerek +4°C'de bir saat bekletilmektedir. Gerekli yıkama basamakları sonrası akım sitometri cihazında (FC500, Beckman Coulter, Miami, USA) veriler toplanmakta ve toplanan sinyaller (10.000 lökosit/tüp) daha sonra analiz edilmek üzere hafızaya kaydedilmektedir.

#### **c. Fosforile-ZAP-70 ifadesinin değerlendirilmesi:**

Bu amaçla kullanılan malzeme ve yöntem şu şekildedir: Tespit solüsyonu: %2'lik formaldehit (Immunotech, Marseille, France). Permeabilizasyon solüsyonu: %90 metanol. Boyama tamponu: %4 Fetal Calf serum (FCS) içeren PBS (koruyucu olarak 1 mM NaN<sub>3</sub>). Anti-Phospho-ZAP-70 antikor, clone pY352 (alexa fluor ile işaretli, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). Anti-CD2<sub>PC5</sub> (Immunotech, Marseille, France). Anti-CD19<sub>PE</sub> (Immunotech, Marseille, France). 100 µL kan örneği üzerine 10'ar µL anti-CD2 ve anti-CD19 antikor eklenir ve oda ısısında karanlıkta 20 dakika bekletilmektedir. Gerekli yıkama ve bekletme basamakları sonrası ortama anti-fosforile-ZAP-70 antikor eklenmektedir. Hücrelerden alınan sinyaller akım sitometri cihazında çalışılarak daha sonra analiz edilmek üzere hafızaya kaydedilmektedir.

**d. Akım sitometri cihazında toplanan verilerin değerlendirilmesi:** Akım sitometri cihazında toplanan veriler, CXP yazılımı (Beckman Coulter, FL, USA) kullanılarak analiz edildi.

İlk olarak CD45/CD14/HLA-DR antikorlarının bulunduğu tüpteki veriler çağırılarak CD45-Side Scatter (SSC) grafiği üzerinde lenfositler işaretlenir. Forward Scatter (FSC)-SSC grafiği üzerinde lenfositlerin adresi belirlenerek bu hücreler bir küme olarak tanımlandıktan sonra tüm analizler bu lenfosit kümesi içinde yapılır. Yüzey antijenlerinin ifadesini değerlendirirken eşik değerlerin belirlenebilmesi için izotipik kontroller ile elde edilen veriler kullanılır.

CD19/CD5/CD2 tüpünde: CD19 ve CD5'i birlikte ifade eden hücreler KLL hücrelerini, CD5 ve CD2 taşıyıp, CD19 taşımayan hücreler T lenfositleri, CD2 ifade ettiği halde CD5 ifade etmeyen hücreler ise doğal öldürücü (NK) hücreleri temsil etmektedir. CD23/CD38/CD20 tüpünde: CD20 taşıyan B hücrelerde CD23 ve CD38 ifadelerinin oranları değerlendirilir. KLL hücrelerinin CD20 ifadelerinin normal B hücrelerden daha zayıf olması beklenmektedir.

Sitoplazmik ZAP-70 (cZAP-70)/CD19/CD2 tüpünde: Bu tüpte CD2'ye yer verilmesinin nedeni, T ve NK hücrelerin cZAP-70 için pozitif kontrol olarak kullanılacak olmalarıdır. ZAP-70 ifadesinin belirlenebilmesi için eşik değer, CD2 taşıyan T ve NK hücrelerinin pozitif olacakları şekilde çizilir. Bu değer kullanılarak, B hücrelerinin yüzde kaçının ZAP-70 ifade ettikleri değerlendirilir. NK hücreler en kuvvetli ZAP-70 ifadesi gösteren hücreler olduklarından işaret koyulurken daha zayıf ZAP-70 ifade eden T hücrelerin dikkate alınması önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda örnekte normal B hücrelerin bulunması durumunda bu hücreler de negatif kontrol olarak değerlendirilir. Yaptığımız çalışmalarda bu yaklaşım kullanıldığında -varsa- normal B hücrelerdeki ZAP-70 ifadesi daima negatif olarak tespit edildi.

Sitoplazmik fosfo-ZAP-70/CD19/CD2 tüpünde: Bu tüpte, hiçbir uyarıcı ile uyarılmamış olan istirahat halindeki B hücrelerde ZAP-70'in fosforile olması ile açığa çıkan epitoplara bulunup bulunmadığı -varlığı- test edildi. Eşik değerlerin belirlenmesinde örnekte bulunan B hücreler dışındaki hücrelerden alınan sinyaller kullanıldı.

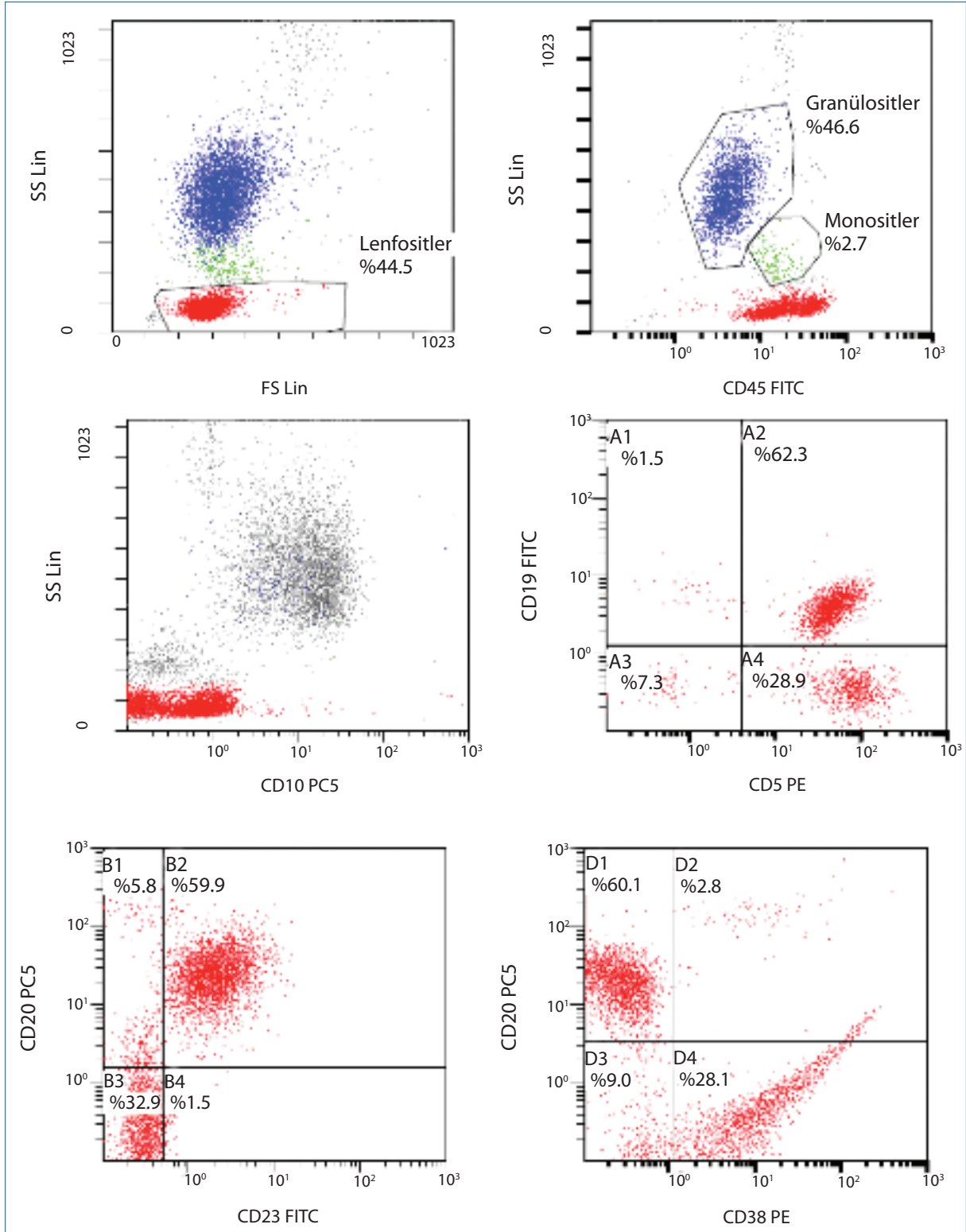
Akım sitometri çalışmalarına ait örnekler Şekil 1, 2, 3 ve 4'te sunuldu.

#### **İstatistiksel Analiz**

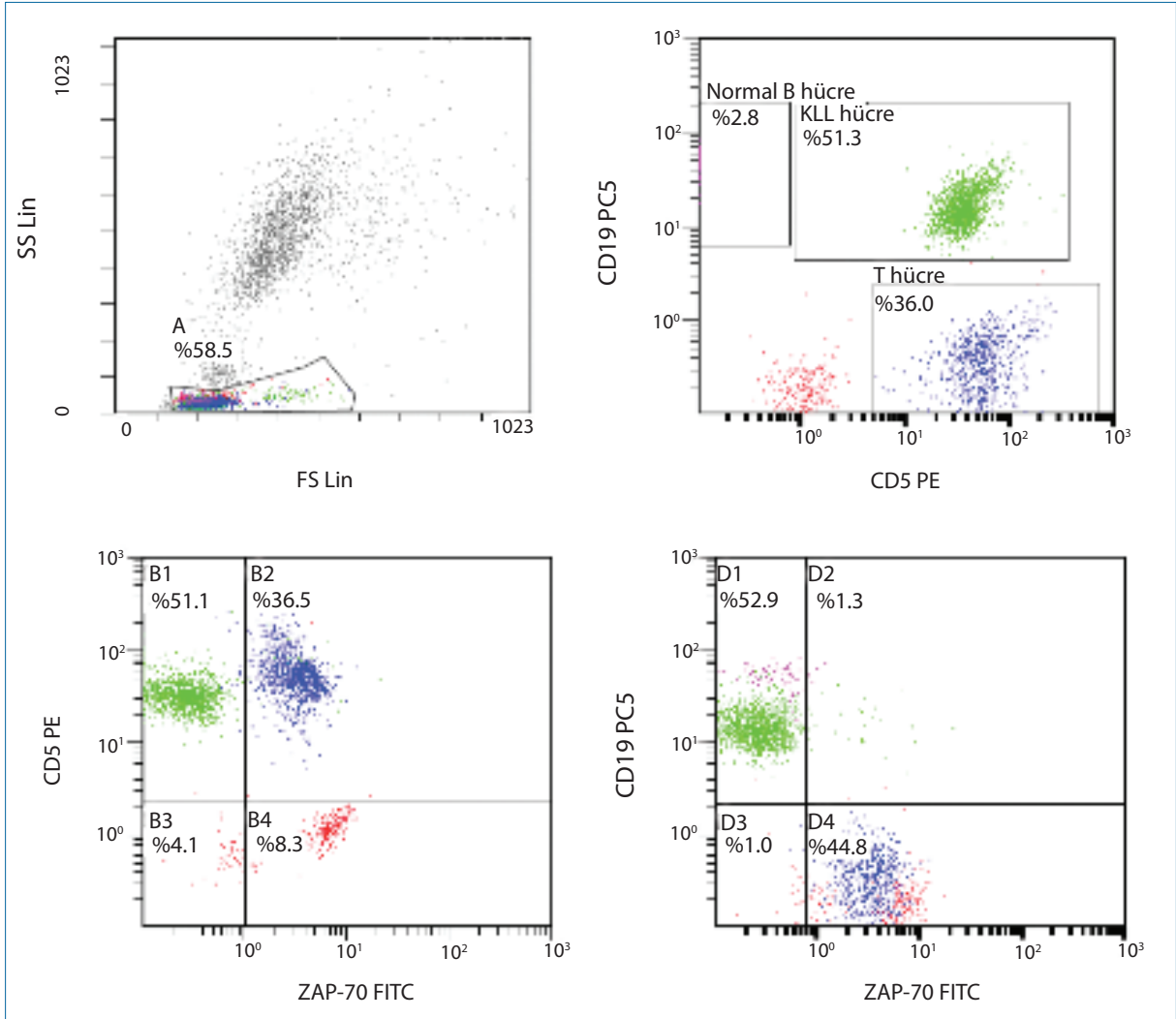
Akım sitometrik olarak irdelenen ZAP-70 ve CD38 ekspresyonları ile klinik/diğer parametrelerin arasındaki ilişkiler ki-kare ve bağılantılı olarak Fisher's Exact Test ile değerlendirildi. Verilerin analizinde ise SPSS (SPSS Inc, Chicago, USA) yazılımı kullanıldı. Tüm analizlerde %5 anlamlılık düzeyi ölçütü alındı. Tüm değerlendirmeler, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalında yapıldı.

#### **BULGULAR**

2006-2008 yılları arasında çalışmaya dahil edilen ardışık 35 KLL hastasının 20'si erkek, 15'i kadın olup, yaş ortalaması  $59.7 \pm 12.2$ 'dir.



**Şekil 1.** Bir KLL olgusunda hücrelerin akım sitometri cihazında analizi. Bu örnekte lökositler arasında kırmızı ile işaretlenerek seçilen lenfositlerin %62'si B hücre olup; bu hücrelerde CD19, CD5, CD20, CD23'ün ifade edildiği, CD38'in ise CD19 (+) olan B hücrelerde ifade edilmediği görülmektedir.



**Şekil 2.** cZAP-70 ifadesinin analizi (negatif örnek).

Olguların çalışmaya katılmasında tek ölçüt olarak KLL tanısına sahip olmaları dikkate alınmıştır. Hastaların takip ve tedavi gereksinimleri ilgili/sorumlu hekimlerinin inisiyatifinde olup çalışma ekibince herhangi bir müdahalede bulunulmamıştır. Toplam 35 olgudan 21'i erken, 14'ü ileri evrede çıkmıştır (sırasıyla %60 ve %40) (14).

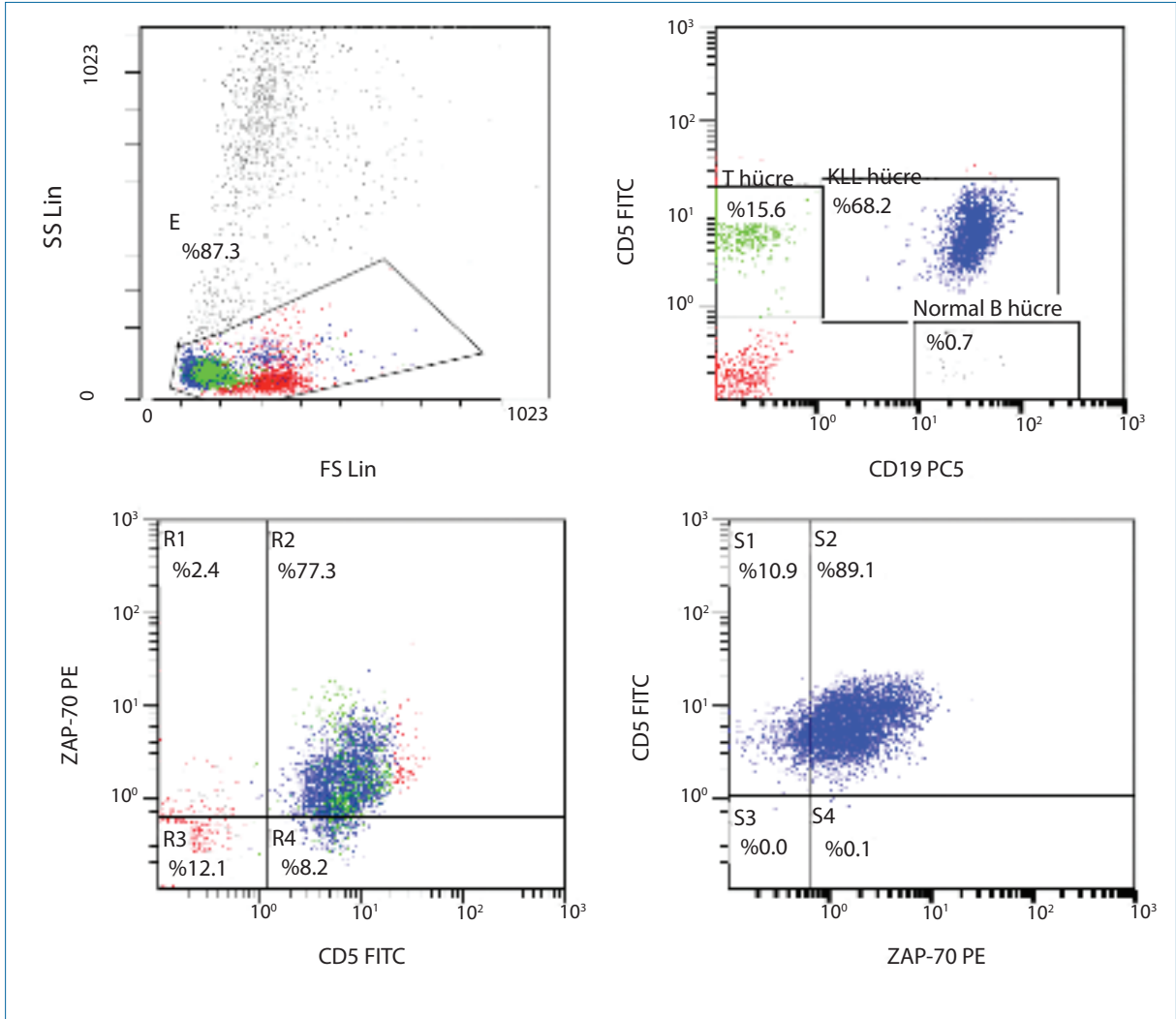
Hastaların cinsiyet ve yaşları ile erken ya da ileri evrede olmaları arasında herhangi bir ilişki saptanamamıştır.

ZAP-70, erken evredeki 21 olgunun 14'ünde negatif (ekspresyon < %20), yedisinde pozitif iken ileri evre için bu analiz 10'unda negatif, dördünde pozitif olarak saptanmıştır. Hastaların evreleriyle ZAP-70 ekspresyonları arasında istatistiksel bir ilişki saptanamamıştır ( $p = 1.000$ ). Hastalardaki CD38 ekspresyonu ile evre arasında da bir ilişki yoktur ( $p = 0.568$ ). Hastaların evreleri ile ZAP-70 ve CD38 ekspresyonları, hastayı hastaneye getiren herhangi bir yakınmasının olup olmadığı, LDH, ÜA, CRP ve beta-2 mikroglobulin

yükseklikleri ile tedavi durumlarını irdeleyen analiz Tablo 1'de sunulmuştur.

ZAP-70 ekspresyonu ile diğer klinik ve laboratuvar verilerinin ilişkisi irdelendiğinde ise sadece yakınma ile hastaneye gelen hastalarda ZAP-70 ekspresyonunun pozitif olduğu görülmüştür (Tablo 2). Dahası, tanı sırasında tedavi gereksinmesi olmayıp ancak ilerleyen süreçte tedavi başlanan hastalar da değerlendirmeye alındığında; 24 ZAP-70 negatif olgunun 21'ine halihazırda tedavi verilmediği, ZAP-70 pozitif olan 11 olgunun ise yedisinin analiz yapıldığı sırada tedavi gereksinmesi olduğu/aldığı saptanmıştır. Hastaların tanı sırasındaki ZAP-70 ekspresyon durumları ile hastalık seyirlerinin ilerleyen dönemlerinde tedavi gereksinmesi oluşması arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır ( $p = 0.004$ ) (Tablo 2). Hastalarda bu parametrelerle CD38 ekspresyonu (ekspresyon  $\geq$  %30) da kıyaslanmış ve herhangi istatistiksel bir ilişki saptanamamıştır (Tablo 3).





**Şekil 3.** cZAP-70 ifadesinin analizi (pozitif örnek).

ZAP-70 ve CD38 ekspresyonlarının korele olup olmadıkları da irdelenmiştir. ZAP-70 ekspresyonu negatif olan 15 olgunun CD38'de eksprese etmediği, ZAP-70 pozitif olan 13 olgunun ise CD38 ekspresyonunun da pozitif olduğu görülürken; ZAP-70 negatif olan 21 olgunun CD38 ekspresyonu açısından pozitif olduğu ve ZAP-70 pozitif olan iki olgunun da CD38 negatif olduğu saptanmıştır. Kappa testi analizinde her iki belirtecin birbirleriyle uyumlu bir ekspresyon profiline sahip olmadıkları görülmüştür.

Çalışmamızda dokuz olguda fosforile-ZAP-70 ekspresyonu pozitif bulunurken 17 olguda negatif saptanmış, dokuz olguda ise sonuç alınamamıştır (Tablo 4). Evre ile fosforile-ZAP-70 ekspresyonu arasında ise anlamlı bir ilişki saptanmıştır ( $p=0.038$ ).

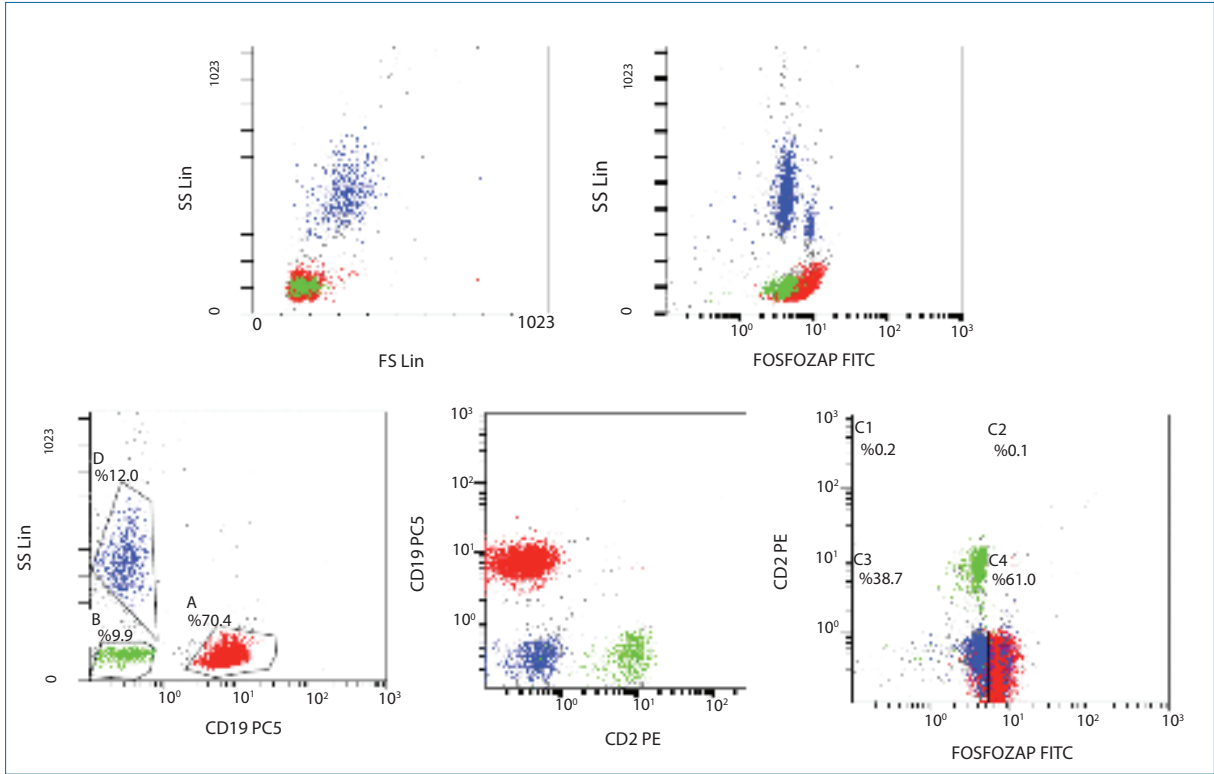
Hastaların tanı sırasında değil, bu analizin yapıldığı sıradaki tedavi durumları irdelendiğinde ise; tedavi alan olguların tanı sırasındaki evre, yakınma, ZAP-70 ve CD38

ekspresyonları ile ilişkisi de irdelenmiştir. Buna göre sadece tanıdaki ZAP-70 ekspresyon varlığı ilerleyen dönemlerdeki tedavi gereksinmesi ile ilişkili bulunmuştur (Tablo 5).

### TARTIŞMA ve SONUÇ

Otuz beş olgunun ZAP-70, CD38 ve fosforile-ZAP-70 ekspresyonlarını akım sitometrik analiz ederek bunları evre, yakınma varlığı ya da tedavi durumu başta olmak üzere çeşitli klinik ve laboratuvar parametrelerle karşılaştığımız çalışma, bir pilot çalışma olması nedeniyle bazı eksiklikler barındırmakla birlikte ülkemizde bu konuda yapılmış ilk analizlerden birisi olması dolayısıyla önem taşımaktadır.

Literatür bilgisine paralel olacak şekilde çalışmamızda, erken evredekilere göre ileri evredeki hastalarda herhangi bir yakınma varken, tedavi alanların çoğu da ileri evredeki hastalardır (15). Ancak burada ilginç olan, kötü bir seyirle ilişkilendirilen ZAP-70 ve CD38 ekspresyonlarının bu du-



**Şekil 4.** Fosforile-ZAP-70 analiz örneği. Mavi olanlar granülosit, yeşiller T/NK hücre (CD2+), kırmızılar B hücreleri (CD19+) temsil etmektedir.

**Tablo 1.** Hastaların evreleri ile ZAP-70 ve CD38 ekspresyonları, hastayı hastaneye getiren herhangi bir yakınmasının olup olmadığı, LDH, ÜA, CRP, B2-MG yükseklikleri ile tedavi durumlarının ilişkisi

Parametre	Evre		p
ZAP-70	E	İ	1.000
CD38	E	İ	0.568
<b>Yakınma (+)</b>	<b>E</b>	<b>İ</b>	<b>0.036</b>
LDH	E	İ	0.112
ÜA	E	İ	0.134
CRP	E	İ	0.145
B2-MG	E	İ	0.357
<b>Tedavi</b>	<b>E</b>	<b>İ</b>	<b>0.046</b>

ZAP-70: 70-kD zeta-associated protein, E: Erken, İ: İleri, LDH: Laktat dehidrogenaz, ÜA: Ürik asit, CRP: C-reaktif protein, B2-MG: Beta-2 mikroglobulin.

ruma eşlik etmediği fakat literatürde KLL seyri ile ilişkisi net olarak tanımlanamayan ama bilindiği üzere ZAP-70'in yüksek aktivitesini ifade eden fosforile-ZAP-70 ekspresyonunun ise bu davranışa paralel olacak şekilde ileri evredeki hastalarda daha fazla eksprese olmasıydı (16). Bilindiği kadarıyla bu bulgu şimdiye kadar literatürde bu kadar aşikar bildirilmemiştir.

Hastayı herhangi bir nedenle hastaneye getiren bir yakınma olması genellikle ileri evrede beklenen bir durum olmakla birlikte, çalışmamızda evreden bağımsız olacak şe-

kilde yakınma varlığı ile ZAP-70 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (p=0.027). Dahası, tanı sırasında ZAP-70 ekspresyon varlığı ile tedavi gereksinmesi arasında bir ilişki saptanamazken, ZAP-70 ekspresyonu pozitif olan olguların hastalıklarının ilerleyen dönemlerinde bir şekilde tedavi almak durumunda kalacakları gözlenmiştir (p=0.004). Zaten son zamanlarda çok sayıda araştırmacı tarafından söyleneğeldiği gibi, akıbeti saptamada evreleme sistemlerinden çok  $IgV_H$  genindeki mutasyon durumunun ve "mutated" durumun bir göstergesi olan ZAP-70 aşırı ekspresyonunun çok daha fazla belirleyici olduğu görüşüne

**Tablo 2. Hastaların ZAP-70 ekspresyonları ile cinsiyet, hastayı hastaneye getiren herhangi bir yakınmasının olup olmadığı, LDH, ÜA, CRP, B2-MG yükseklikleri ile tedavi durumlarının ilişkisi**

Parametre	ZAP-70		p
	Negatif	Pozitif	
Cinsiyet	Negatif	Pozitif	0.255
<b>Yakınma (+)</b>	<b>Negatif</b>	<b>Pozitif</b>	<b>0.027</b>
LDH	Negatif	Pozitif	0.487
ÜA	Negatif	Pozitif	0.054
CRP	Negatif	Pozitif	0.298
B2-MG	Negatif	Pozitif	0.421
Tanıda tedavi	Negatif	Pozitif	0.057
<b>Güncel tedavi</b>	<b>Negatif</b>	<b>Pozitif</b>	<b>0.004</b>

ZAP-70: 70-kD zeta-associated protein, LDH: Laktat dehidrogenaz, ÜA: Ürik asit, CRP: C-reaktif protein, B2-MG: Beta-2 mikroglobulin.

**Tablo 3. Hastaların CD38 ekspresyonları ile cinsiyet, hastayı hastaneye getiren herhangi bir yakınmasının olup olmadığı, LDH, ÜA, CRP, B2-MG yükseklikleri ile tedavi durumlarının ilişkisi**

Parametre	CD38		p
	Negatif	Pozitif	
Cinsiyet	Negatif	Pozitif	1.000
Yakınma (+)	Negatif	Pozitif	0.762
LDH	Negatif	Pozitif	0.175
ÜA	Negatif	Pozitif	1.000
CRP	Negatif	Pozitif	0.495
B2-MG	Negatif	Pozitif	0.354
Tedavi	Negatif	Pozitif	0.282

LDH: Laktat dehidrogenaz, ÜA: Ürik asit, CRP: C-reaktif protein, B2-MG: Beta-2 mikroglobulin.

**Tablo 4. Hastaların evrelere göre fosforile-ZAP-70 ekspresyon durumları: Evre ile fosforile-ZAP-70 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptandı (p= 0.038)**

Evre	Fosforile-ZAP-70		Toplam
	Negatif	Pozitif	
Erken	12 (%85.7)	<b>2 (%14.3)</b>	14 (%100)
İleri	5 (%41.7)	<b>7 (%58.3)</b>	12 (%100)
<b>Toplam</b>	17 (%65.4)	<b>9 (%34.6)</b>	26 (%100)

ZAP-70: 70-kD zeta-associated protein.

**Tablo 5. Hastaların analizin yapıldığı sırada -güncel- tedavi durumları ile tanı sırasındaki özelliklerinin karşılaştırılması**

Parametre (tanıdaki)	Güncel tedavi gereksinmesi		p
	Var	Yok	
Evre	Var	Yok	0.345
<b>ZAP-70</b>	Var	Yok	<b>0.027</b>
CD38	Var	Yok	0.127
LDH	Var	Yok	0.540
ÜA	Var	Yok	0.451
CRP	Var	Yok	0.310
B2-MG	Var	Yok	0.312

ZAP-70: 70-kD zeta-associated protein, LDH: Laktat dehidrogenaz, ÜA: Ürik asit, CRP: C-reaktif protein, B2-MG: Beta-2 mikroglobulin.



paralel olacak şekilde biz de çalışmamızda güncel tedavi durumunun öngörülmesinde tanı sırasında sadece ZAP-70 varlığının değerli/anlamli olduğunu ortaya koymuş bulunmaktayız.

Çalışmada CD38 aşırı ekspresyonu ile başka parametrelerin ilişkisi ya da tedavi gereksinmesinin öngörülebilmesi sonucu saptanamamıştır. Dahası her ikisi de kötü seyir göstergesi olan ve literatürde genellikle pozitif yönde korelasyonu saptanan CD38 ve ZAP-70 ekspresyonları ise bizim çalışmamızda korele bulunmamıştır (17).

LDH, ÜA, CRP ve beta-2 mikroglobulin düzeylerinin ise çalışmamızda evre ya da diğer prognostik belirteçlerle (ZAP-70 ve CD38) anlamlı bir ilişkisi saptanamamıştır.

Hedefe yönelik ilaçların çok daha fazla yaygınlaştığı günümüzde amaç artık pek çok hastalıkta “minimal kalıntı hastalık” ya da “minimal ölçülebilir hastalık” elde etmektir. Bu yolda ilaçların çok daha erken dönemlerde tedavi alanına sokuldukları ya da daha uzun süre kullanıldıkları aşikardır. KLL’de *IgV<sub>H</sub>* genindeki mutasyon durumunun saptanması çalışmanın planlandığı dönemlere benzer şekilde günümüzde de tüm dünya çapında yaygınlaşmamıştır. Dolayısıyla ZAP-70 ekspresyonunun ve dahası fosforile-ZAP-70 ekspresyonunun, hedefe yönelik tedavilerin yaygınlaştığı günümüzde prospektif çalışmalarda, tedavi gereksinmesini, tedaviyi kesme kararını ve nihayetinde de sağkalımı öngörmeye önemli bir belirteç olarak kullanılmaya devam edileceği aşikardır.

## ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 27 Mart 2006 tarih ve 89-2321 sayı ile onaylandı.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarların çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## MALİ AÇIKLAMA

Çalışma için doğrudan veya dolaylı mali destek alınmadı. Çalışma ile ilgili herhangi bir firma veya kişi ile ilgili ticari bağlantı yoktur.

## YAZAR KATKISI

Literatür taranması: SKT; Verilerin Toplanması: SKT, KD; Makalenin Yazımı: SKT, KD, MÖ; Onaylama: SKT, KD, MÖ

## KAYNAKLAR

1. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004;363(9403):105-11.
2. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2004;351(9):893-901.

3. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002;99(3):1023-9.
4. Lin K, Sherrington PD, Dennis M, Matrai Z, Cawley JC, Pettitt AR. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100(4):1404-9.
5. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002;100(4):1177-84.
6. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001;194(11):1625-38.
7. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001;194(11):1639-47.
8. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003;348(18):1764-75.
9. Guillaume N, Alleaume C, Munfus D, Capiod JC, Touati G, Pautard B, et al. ZAP-70 tyrosine kinase is constitutively expressed and phosphorylated in B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells. *Haematologica* 2005;90(7):899-905.
10. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O’Brien S, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: Revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996;87(12):4990-7.
11. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* 2018;131(25):2745-60.
12. Melillo L, Musto P, Tomasi P, Cascavilla N, Bodenizza C, Ladogana S, et al. Serum beta 2-microglobulin in malignant lymphoproliferative disorders. *Tumori* 1988;74(2):129-35.
13. Cmunt E, Michalova K, Sindelarova L, Karban J, Zemanova Z, Kurkova S, et al. Importance of prognostic factors in patients with chronic B-lymphocytic leukemia at the time of diagnosis. *Sb Lek* 2002;103(3):359-70.
14. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46(2):219-34.
15. Schiattone L, Ghia P, Scarfo L. The evolving treatment landscape of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Oncol* 2019;31(6):568-73.
16. Kaplan D, Meyerson HJ, Li X, Drasny C, Liu F, Costaldi M, et al. Correlation between ZAP-70, phospho-ZAP-70, and phospho-Syk expression in leukemic cells from patients with CLL. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78(2):115-22.
17. Del Giudice I, Morilla A, Osuji N, Matutes E, Morilla R, Burford A, et al. Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2005;104(10):2124-32.