

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**KRONİK LENFOİD LÖSEMİLİ HASTALARDA ERİTROSİT MEMBRAN
LİPİD PROFİLİ, OKSİDATİF STRES VE DNA HASARI
PARAMETRELERİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ
DR. BAHADIR KARAKULA

DANIŞMAN
DOÇ. DR. GÜLSÜM AKGÜN ÇAĞLIYAN

DENİZLİ-2023

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

KRONİK LENFOİD LÖSEMİLİ HASTALARDA ERİTROSİT MEMBRAN
LİPİD PROFİLİ, OKSİDATİF STRES VE DNA HASARI
PARAMETRELERİNİN İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ
DR. BAHADIR KARAKULA

DANIŞMAN
DOÇ. DR. GÜLSÜM AKGÜN ÇAĞLIYAN

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 23.06.2021 tarih ve 2021TIPF027 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ-2023

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimimde, tez çalışmamın başlangıcından tamamlanma aşamasına kadar yürütülmesinde her türlü desteği veren, tecrübeleriyle yol gösteren çok değerli hocam Doç. Dr. Gülsüm AKGÜN ÇAĞLIYAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın deneysel aşamalarının yürütülmesinde, samimiyetle yol gösteren Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Ayşegül ÇÖRT DÖNMEZ'e, Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Emine KILIÇ TOPRAK'a ve katkılarını esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan Araş. Gör. Dr. Fatih ALTINTAŞ ve Araş. Gör. Dr. Melek TUNÇ ATA'ya,

Uzmanlık yolunda bilgi ve tecrübeleri ile yolumuza ışık tutan bütün değerli hocalarıma, asistanlık eğitimi boyunca birbirimize destek olduğumuz tüm asistan hekim ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

Asistanlık eğitimim döneminde yoğun çalışma temposundan dolayı yeterince vakit ayıramadığım, bugüne kadar hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili eşim Hamiyet'e ve göz aydınlığı evlatlarım Hüseyin ve Süleyman'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ	vii
KISALTMALAR LİSTESİ	viii
ÖZET.....	xiv
SUMMARY.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ	3
2.1.1. Giriş ve Tanım.....	3
2.1.2. Epidemiyoloji	4
2.1.3 Etiyoloji.....	4
2.1.4 Patogenez	4
2.1.5. Klinik Bulgular	6
2.1.6. Laboratuvar Bulguları	7
2.1.7. Tanı	8
2.1.8. Ayırıcı Tanı.....	10
2.1.9. Sitogenetik ve Moleküler Genetik	11
2.1.10. Klinik Evreleme	12
2.1.10.1. Rai Evreleme Sistemi	13
2.1.10.2 Binet Evreleme Sistemi	13
2.1.11. Prognoz	14
2.1.12. Tedavi.....	16
2.1.12.1. Tedavi Endikasyonları	16
2.1.12.2. Tedavi Öncesi Değerlendirme	18
2.1.12.3. Birinci Basamak Tedaviler	19
2.1.12.4. Relaps/Refrakter Olgularda Tedavi	22
2.1.12.5. Hedefe Yönelik Ajanlar	22
2.1.12.6 Tedaviye Yanıtın Değerlendirilmesi.....	26
2.1.13. Komplikasyonlar.....	28

2.1.13.1. Enfeksiyonlar.....	28
2.1.13.2. Richter Transformasyonu (RT).....	29
2.1.13.3. Otoimmün Komplikasyonlar	30
2.1.13.4. İkincil Maligniteler.....	30
2.2. SERBEST RADİKALLER.....	30
2.3. ANTİOKSİDAN SİSTEMLER	31
2.4. OKSİDATİF STRES	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. ÇALIŞMAYA ALINAN HASTA VE KONTROL GRUBUNUN ÖZELLİKLERİ.....	33
3.2. ÖLÇÜMLERİN YAPILMASI VE ÖRNEKLERİN TOPLANMASI	33
3.2.1. Kan Örneklerinden Lökosit İzolasyonu	34
3.2.2. Kan Örneklerinden Serum İzolasyonu	34
3.3. OKSİDATİF STRES VE COMET YÖNTEMİ İLE DNA HASARI PARAMETRELERİNİN ÖLÇÜMÜ	35
3.3.1. Total Oksidan Seviye (TOS) Ölçümü:	35
3.3.2. Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü:	35
3.3.3. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ):	35
3.3.4. Comet assay ile DNA Hasarı İncelemesi:	35
3.3.5. Serum 8-OHdG Ölçümü:	36
3.3.6. Gaz Kromatografik Analiz:	37
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	37
4. BULGULAR	38
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇLAR	60
KAYNAKLAR.....	61

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. KLL Ayırıcı Tanısında Klasik İmmünofenotipler (77–79)	11
Tablo 2. Rai Evreleme Sistemi	13
Tablo 3. Binet Evreleme Sistemi	14
Tablo 4. KLL’de prognoz üzerine etkili genetik risk faktörleri (95).....	15
Tablo 5. KLL-IPI skorlama sistemi (95)	16
Tablo 6. KLL-IPI sınıflamasına göre risk grupları ve sağkalım oranları (95).....	16
Tablo 7. Birinci Basamak Tedavi Alternatifleri (83)	20
Tablo 8. Relaps/Refrakter Vakalarda Tedavi Alternatifleri (83)	23
Tablo 9. Çalışmaya Katılan Tüm Kişilerin Yaş ve Cinsiyet Verileri	38
Tablo 10. Çalışmaya Katılan Tüm Kişilerin Tam Kan Sayımı, Biyokimyasal ve Koagülasyon Parametre Verileri	38
Tablo 11. Çalışmaya Katılan Tüm Kişilerin Comet Yöntemi ile DNA Hasar, 8-OHdG ve Oksidatif Stres Parametre Verileri	39
Tablo 12. Yaş ve Cinsiyet Verilerinin Gruplar Arası Analizi.....	40
Tablo 13. Tam Kan Sayımı Parametrelerinin Gruplar Arası Analizi	40
Tablo 14. Biyokimyasal Parametrelerin Gruplar Arası Analizi	41
Tablo 15. Koagülasyon Parametrelerinin Gruplar Arası Analizi	41
Tablo 16. Oksidatif Stres Parametrelerinin Gruplar Arası Analizi	42
Tablo 17. Comet Yöntemi ile DNA Hasar Parametrelerinin Gruplar Arası Analizi..	42
Tablo 18. 8-OHdG Düzeyinin Gruplar Arası Analizi	43
Tablo 19. Eritrosit Membran Yağ Asitlerinin Gruplar Arası Analizi	43

KISALTMALAR LİSTESİ

- 4-HC:** 4-hidroperoksisiklofosfamid
- 8-OHdG:** 8-hidroksi-2'-deoksiguanizin
- ABTS:** 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit
- ADCC:** Antikor bağımlı sitotoksisite
- AF:** Atrial fibrilasyon
- ALL:** Akut lenfoid lösemi
- ALT:** Alanin aminotransferaz
- AML:** Akut miyeloid lösemi
- ANCOVA:** Düzeltilmiş Kovaryans Testi Analizi
- APTT:** Aktive parsiyel tromboplastin zamanı
- AST:** Aspartat transaminaz
- ATL:** Erişkin T hücreli lösemi/lenfoma
- ATM:** Ataksi telenjiektazi mutant
- BAP:** Biyolojik antioksidan potansiyeli
- BCL-2:** B hücreli lösemi/lenfoma 2
- BCR:** B hücre reseptörü
- BIRC3:** Baculoviral IAP repeat-containing 3
- BT:** Bilgisayarlı tomografi
- BTK:** Bruton tirozin kinaz
- CAT:** Katalaz
- CD:** Konjuge dien
- CDC:** Kompleman bağımlı sitotoksisite

CIRS: Cumulative illness rating scale

CMV: Sitomegalovirüs

CR: Tam yanıt

CrCl: Kreatinin klirensi

Del: Delesyon

DHA: Dokosaheksaenoik asit

DLBCL: Diffüz büyük B hücreli lenfoma

DM: Diyabetes Mellitus

DNA: Deoksiribo nükleik asit

D-ROM: Türetilmiş reaktif oksijen metabolitleri

ECOG: Eastern cooperative oncology group

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

EPA: Eikosapentaenoik asit

ERIC: European Research Initiative on CLL

FAME: Yağ asit metil ester

FCR: Fludarabin-Siklofosfamid-Rituksimab

FISH: Floresan in-situ hibridizasyon

FL: Foliküler lenfoma

FORD: Antioksidan kapasite testi

FORT: Serbest oksijen radikal testi

GC: Gaz Kromatografi

GPx: Glutatyon peroksidaz

GSH: Redükte glutatyon

GSSG: Okside glutatyon

GSSG-R: Glutatyon redüktaz

GST: Glutatyon transferaz

H₂O₂: Hidrojen peroksit

HBsAg: Hepatit B yüzey antijeni

HBV: Hepatit B virüsü

HCL: Saçlı hücreli lösemi

HCT: Hematopoetik hücre transplantasyonu

HCV: Hepatit C virüsü

HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein

Hgb: Hemoglobin

HIV: İnsan immünyetmezlik virüsü

HL: Hodgkin Lenfoma

HO⁻: Hidroksil radikali

HSC: Hematopietik kök hücre

HT: Hipertansiyon

ID80: Hücrelerin yaşayabilirliğinde %80'lik bir azalmaya neden olan hesaplanmış bir doz

IGHV: İmmünglobulin ağır zincir değişken bölgesi

IPI: Uluslararası prognoz indeksi

ITP: İmmün trombositopenik purpura

IWCLL: Uluslararası KLL Çalışma Grubu

KLL: Kronik lenfositer lösemi

LAP: Lenfadenopati

LDH: Laktat dehidrogenaz

LDT: Lenfosit ikilenme zamanı

LMA: Low melting agaroz

LPL: Lenfoplazmositik lenfoma

MBL: Monoklonal B hücreli lenfositoz

MCH: Ortalama hücre hemoglobin

MCHC: Ortalama hücre hemoglobin konsantrasyonu

MCL: Mantle hücreli lenfoma

MCV: Ortalama hücre hacmi

MDA: Malondialdehit

MDS: Miyelodisplastik sendrom

MiRNA: MikroRNA

MM: Multipl miyelom

MRD: Minimal rezidüel hastalık

MUFA: Monounsature yağ asidi

NEU: Nötrofil

NGAL: Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin

NHL: Non-Hodgkin Lenfoma

NMA: Normal melting agaroz

NO: Nitrik oksit

O₂⁻: Süperoksit radikali

O₂↑↓: Singlet oksijen

OİHA: Otoimmün hemolitik anemi

OSİ: Oksidatif stres indeksi

PBS: Fosfat tamponu

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

PD: Progrese hastalık

PET: Pozitron Emisyon Tomografi

PI3K: Fosfatidilinozitol-3-kinaz

PLL: Prolenfositik lenfoma

PLT: Trombosit

PR: Kısmi yanıt

PRCA: Saf kırmızı hücre aplazisi

PS: Performans skoru

PTZ: Protrombin zamanı

PUFA: Poliunsatüre yağ asidi

RB: Rituksimab-Bendamustin

ROS: Reaktif oksijen türleri

RT: Richter Transformasyonu

SD: Stabil hastalık

SEER: The Surveillance, Epidemiology and End Results

SF3B1: Splicing faktör 3B subünit 1

SFA: Satüre yağ asidi

SIg: Yüzey immünglobulini

SLL: Küçük lenfositik lenfoma

SMZL: Splenik marjinal zon lenfoma

SOD: Süperoksit dismutaz

SOS: Oksidatif stres skoru

SPSS: Statistical Package Social Science

TAS: Total antioksidan status

TBARS: Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri

TFA: Trans yağ asidi

TFT: İlk tedaviye kadar geçen süre

TLS: Tümör lizis sendromu

TOS: Total oksidan status

TP53: Tümör protein 53

TSPO: Translokator protein

USG: Ultrasonografi

UV: Ultraviyole

UVC: Ultraviyole C

VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü

VZV: Varisella zoster virüsü

WBC: Beyaz kan hücresi

ZAP-70: Zeta ilişkili protein 70

ÖZET

Kronik lenfoid lösemili hastalarda eritrosit membran lipid profili, oksidatif stres ve DNA hasarı parametrelerinin incelenmesi

Dr. Bahadır KARAKULA

Kronik lenfositik lösemi (KLL), en sık tanı alan lösemi türüdür ve yetişkinlerdeki tüm lösemilerin yaklaşık %30'unu oluşturur. KLL insidansı yılda 4.2/100.000'dir. Medyan tanı yaşı 72'dir. KLL insidansı erkeklerde kadınlardan daha yüksektir ve erkek-kadın oranı 1.9:1'dir. Çalışmada, KLL hastalarında sistemik oksidatif stres parametreleri, KLL hastalarında comet yöntemi ile izole edilen lenfositlerde DNA hasarı varlığı, eritrosit membran lipid profili araştırıldı. Çalışmamıza Haziran 2021 - Aralık 2022 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi İç Hastalıkları Hematoloji polikliniğine başvuran, yeni tanı 38 KLL hasta ile yaş-cinsiyet uyumlu 38 kontrol grubu dahil edildi. TOS ve TAS ölçümleri, OSİ, Comet analizi ile DNA hasarı incelemesi, serum 8-OHdG, gaz kromatografik analiz gerçekleştirildi. Olgu grubunda TOS ve OSİ değerinin kontrol grubundan daha yüksek olduğu gözlemlendi (sırasıyla $p=0.014$ ve $p=0.022$). Olgu ve kontrol grubu arasında TAS ve 8-OHdG değerinde anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$). Comet yöntemi ile ölçülen DNA hasarının olgu grubunda arttığı saptandı ($p<0.05$). Membran yağ asitleri düzeyi, olgu grubunda kontrol grubuna göre azalmış bulunsa da, istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

Sonuç olarak, KLL'de oksidatif stres ve DNA hasarının arttığı gözlemlendi. Çalışmamızın prognostik bir önemi olduğuna ve potansiyel terapötik etkileri olan hastalığın biyolojik olarak anlaşılmasında yeni fikirler ortaya çıkardığına inanıyoruz.

Anahtar kelimeler: Oksidatif stres, DNA hasarı, Eritrosit membran lipid profili, Kronik lenfositik lösemi

SUMMARY

Investigation of Erythrocyte Membrane Lipid Profile, Oxidative Stress and the parametres of DNA Damage in Patients with Chronic Lymphoid Leukemia

Dr. Bahadır KARAKULA

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most commonly diagnosed type of leukemia, represents about 30% of all leukemias in adults. The incidence of CLL is 4.2/100.000 per year. The median age of diagnosis of 72 years. The incidence of CLL is higher in males than in females, with a male-to-female ratio of 1.9:1. In the study, we investigated systemic oxidative stress parametres in CLL patients, the presence of DNA damage, erythrocyte membrane lipid profile in lymphocytes isolated by the comet method in CLL patients. In the study, 38 newly diagnosed CLL patients and 38 age-sex matched control groups were included in Pamukkale University Medical Faculty Hospital, Department of Hematology between June 2021 and December 2022. TOS and TAS , OSI, Comet analysis, DNA damage, serum 8- OHdG, gas chromatographic analyzes were performed. It was observed that the results of TOS and OSI in the case group were higher than the control group ($p=0.014$ and $p=0.022$, respectively). There is no significant difference in terms of TAS and 8-OHdG between the case and the control group ($p>0.05$). It was determined that DNA damage was increased by measured Comet method at the case group. Although the level of membrane fatty acids was decreased in the case group compared to the control group, no significant difference was found statistically. ($p>0.05$)

In conclusion, it has been observed that oxidative stress and DNA damage increased in CLL. We believe that our study have a a prognostic significance and getting new opinion in the biological comprehension of the disease with potential therapeutic implications.

Key words: Oxidative stress, DNA damage, Erythrocyte membrane lipid profile, Chronic lymphocytic leukemia.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik lenfositik lösemi (KLL), görülme sıklığı 4.2/100.000/yıl olan erişkinlerde en sık görülen lösemidir. Ortanca tanı yaşı 72'dir. KLL hastalarının yalnızca %10'u 55 yaşın altındadır. Erkeklerde kadınlara göre yaklaşık iki kat daha fazla görülmektedir. Tanısı için, periferik kanda $>5.000/mm^3$ monoklonal B lenfositöz varlığı, dolaşımdaki B-lenfositlerin klonalitesi akım sitometri ile doğrulanmalıdır. Periferik kandaki lösemik hücreler dar sitoplazmalı, yoğun çekirdekli, çekirdekçik içermeyen, küçük olgun lenfositlerdir. Büyük, atipik lenfositler veya prolenfositler görülebilmekle birlikte oranı %55'i aşmamalıdır. KLL hücreleri B hücre yüzey belirteçleri (CD19, CD20 ve CD23) dışında CD5 de taşırlar. Yüzey immünoglobulin, CD20 ve CD79b normal B-lenfositlere göre daha düşük ifade edilir. Lösemik hücre klonu kappa veya lambda hafif zincirlerinden birini taşır.

Yapılan etiyolojik çalışmalarda kimyasal ajanlar, radyasyon, diyet, viral enfeksiyonlar ve otoimmün hastalıkların KLL gelişimindeki etkisi, net olarak gösterilememiştir. KLL'nin antioksidan enzimlerdeki değişiklikler ve oksidatif strese karşı duyarlı bir hastalık olduğu, bu hastalarda baskın bir oksidatif stres varlığı ise, daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Sağlıklı bireylerde, biyolojik sıvılarda belirli miktarlarda oksidan moleküller ortaya çıkabilir. Ancak, bunların meydana getirdiği zararı önlemek için savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Bu mekanizmalar antioksidan savunma sistemleri veya antioksidanlar olarak bilinmektedir. Reaktif oksijen türleri (ROS) oldukça yüksek reaktif moleküller olup; lipid, protein ve DNA gibi hücrel bileşenleri kolayca okside edebilmektedir. Sonuç olarak çift sarmal DNA yapısında hasar ortaya çıkmaktadır ve metabolizma bozukluğu, hücre ölümü ya da mutant özelliklerle tümör meydana gelmektedir. Oksidatif stres, ROS konsantrasyonlarının fizyolojik seviyenin üzerine çıkması olarak tanımlanmaktadır. Bu durum antioksidan savunma mekanizmalarında artma veya azalma yönünde değişikliklere neden olmaktadır. Oksidatif stresin değerlendirilmesinde en sık kullanılan yöntem, kan *total oksidan status* (TOS) ve *total antioksidan status* (TAS) düzeylerinin ölçülmesidir. DNA hasarı ve onarım mekanizmalarındaki bozukluklar ile kanser, yaşlanma ve birçok genetik hastalık arasında nedensel bir ilişkinin varlığı gösterilmiştir. *Tek hücre jel elektroforezi* veya

comet analizi, DNA hasarını belirlemede oldukça hassas, güvenilir, tekrarlanabilir, basit ve hızlı bir yöntem olup, genellikle periferik lenfosit izole edilerek uygulanmaktadır. Literatürde, KLL hastalarında oksidatif stres üzerine yapılmış çok az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışmamızda, KLL hastalarında sistemik oksidatif stres parametrelerinin yanı sıra, comet yöntemi ile izole edilen lenfositlerde DNA hasarı varlığı ve eritrosit membran lipit profili de araştırılmıştır. Elde edilen veriler ile KLL patogenezi ve gelecek tedaviler ile ilgili bilimsel katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ

2.1.1. Giriş ve Tanım

KLL veya küçük lenfositik lenfoma (SLL), olgun fakat immünojenik olarak işlevsiz B lenfositlerinin artan üretimi ve birikimi ile karakterize, yavaş ilerleyen, monoklonal lenfoproliferatif bir hastalık olarak tanımlanır (1). Periferik kanda, kemik iliğinde ve lenfoid dokularda küçük, olgun görünümlü lenfositlerin birikmesi ile karakterize CD5 pozitif B hücrelerin bir malignitesidir (2–4).

KLL ve SLL, patolojik ve immünojenotipik açıdan aynıdır. Her ikisi de, B hücreli lenfositlerden kaynaklanır. Ancak anormal hücrelerin nerede bulunduğuyla ilgili olarak farklı belirtiler gösterir. Genellikle, hücrelerin kanda bulunduğu faz KLL olarak adlandırılır. Bu süreç, sonunda hücrelerin lenf düğümlerinde bulunduğu SLL fazına ilerler. SLL terimi, çoğunlukla lenf düğümleriyle sınırlı lenfoproliferatif süreci ifade etmek için kullanılır (1).

Bir B lenfosit klonunun periferik kanda en az 3 ay boyunca $<5000/\mu\text{l}$ kadar bulunması Monoklonal B hücreli lenfositoz (MBL) olarak tanımlanır (5). Asemptomatik ve premalign bir durumdur. Prevalansı KLL'den birkaç yüz kat fazladır. B lenfosit kaynaklı lenfoproliferatif hastalıkların kliniğinde görülen sitopeni, LAP, splenomegali ve ekstremiteler tutulumuna MBL'de rastlanmaz (6,7). İmmünojenotipik özelliklerine göre 3 alt kategori tanımlanmıştır: KLL benzeri, CD5(+) atipik ve CD5(-) MBL. KLL benzeri MBL, açık ara en yaygın görülen tipidir ve KLL'nin immünojenotipik özelliklerini gösterir (7). Prevalansı yaşla birlikte belirgin şekilde artar, 60 yaş üstü kişilerde % 10'un üstüne çıkar (8–10). Ayrıca, KLL'den etkilenen hastaların akrabaları arasında daha sık görülür (11–14). Yapılan bir çalışmada KLL tanılı hastaların birinci derece akrabalarının yaklaşık %17'sinde akım sitometri ile MBL tespit edilmiştir (14). KLL benzeri MBL'nin KLL'ye dönüşme riski 6 yıllık takipte yaklaşık %15 iken, tedavi gerektiren KLL'ye dönüşüm riski ise yıllık %1-2 civarındadır (8).

2.1.2. Epidemiyoloji

KLL, batı ülkelerinde en sık görülen erişkin lösemisidir (3,15). Yaş arttıkça insidansı artmaktadır (2,15). Batı toplumunda 4.2/100.000/yıl olan insidans, 80 yaş üstünde 30/100.000/yıl'ın üzerine çıkar. Ortanca tanı yaşı 72'dir. KLL hastalarının yaklaşık %10'unun 55 yaşından genç olduğu bildirilmektedir. (16,17). Erkeklerde kadınlara göre yaklaşık iki kat (1,9:1) daha fazla görülür (18). Bütün dünyada her yıl yaklaşık 190.000 yeni vaka görülmektedir ve KLL nedeni ölüm sayısı yaklaşık 60.000'dir (19).

İnsidans, ırk ve coğrafi bölge farklılığına göre değişkenlik göstermektedir. ABD'de yaşayan Kafkasyalılardaki hastalık insidansı, Afro-Amerikalılara ve Asya Pasifik Adalılara göre daha yüksektir (20). Asya ülkelerindeki hastalık insidansı ise oldukça düşüktür ve batı ülkelerindeki hastalık insidansının yaklaşık %10'una tekabül ettiği tahmin edilmektedir (20,21).

2.1.3 Etiyoloji

KLL'nin etiyojisi net değildir. Birçok malign neoplaziden farklı olarak, KLL'de çevresel maruziyet ile hastalık arasında kesin bir bağlantı kurulamamıştır (22–24). Çiftçilikle uğraşanlar, benzen veya ağır solvent maruziyeti olanlar, kauçuk imalatı yapan işçiler için artmış KLL riskinden söz edilse de, maruziyetler ile hastalık arasındaki ilişki ispatlanamamıştır (24–26)

KLL'nin genetik geçişine dair net veriler bulunmamaktadır ancak hastalığın alt tiplerinin genetik bir temelini olduğunu gösteren önemli kanıtlar mevcuttur (27). KLL, güçlü bir ailesel risk bileşenine sahiptir ve hastaların birinci derece akrabaları, kontrollerin akrabalarıyla karşılaştırıldığında 8,5 kat daha fazla risk göstermektedir (28).

KLL'nin radyasyona maruziyet ile de ilişkisi bulunamamıştır. Nükleer silaha maruz kalanlarda diğer lösemi türlerinin insidansı artarken, KLL insidansında farklılık olmadığı görülmüştür (29,30)

2.1.4 Patogenez

KLL patogenezini, hematopoietik kök hücrelerin (HSC) klonal lenfositlere

farklılaşmasından kaynaklanmaktadır (31,32). Periferik kan, kemik iliği, lenf nodları ve dalakta monoklonal, olgun, fonksiyonel olarak yetersiz ve tipik olarak CD5 eksprese eden B lenfositlerinin klonal proliferasyonu ve birikimi söz konusudur. KLL hücreleri, CD5 ile birlikte B hücre yüzey antijenleri olan CD19, CD20 ve CD23'ü eksprese eder. Yüzey immünoglobulin, CD20 ve CD79b düzeyleri, normal B hücrelerine kıyasla karakteristik olarak düşüktür (33–35). İmmünoglobulinler genellikle sadece IgM tipinde veya daha az sıklıkta hem IgM hem de IgD tipinde olabilir. KLL hücreleri çoğunlukla kappa veya lambda immünoglobulin hafif zincirlerinden birini eksprese eder (33,35).

Büyük bir kohort çalışması, hastaların neredeyse tamamının, monoklonal B lenfositoz (MBL) aşamasından KLL'ye dönüştüğünü göstermiştir (36). MBL gelişimini ve KLL'ye dönüşümü başlatan olay bilinmemektedir. Antijenik stimülasyon, kemik iliğindeki mikroçevresel değişiklikler, genetik faktörler ve epigenetik modifikasyon gibi etkenlerin muhtemel birlikteliği ile olduğu düşünülmektedir. Hem KLL hem de MBL'li hastalarda oligoklonal B hücre klonlarının varlığı, ilk onkogenik olayların progenitör hücreler veya HSC'ye kadar geriye gittiği fikrini desteklemektedir (37).

KLL'deki lösemik hücreler, kontrolsüz proliferasyona uğrayan ve apoptoz mekanizması bozulan monoklonal B lenfositlerdir. Morfolojik olarak küçük, matür B lenfositlerdir fakat fonksiyonel olarak yetersizdirler. Bu hücreler, B lenfositlerin klonal diferansiasyon yolağında pre-B ve matür-B hücresi arasında bir basamakta duraklamıştır (38,39). Lösemik hücrelerin yüzeyinde fonksiyonel BCR ekspresyonu vardır (40). Bu hücrelerin işlevsel kapasitesi, matür B lenfositlere göre daha düşük olduğu için, immün sistemde yetersizlik meydana gelir.

Hipogamaglobulinemi, KLL'de en sık tanımlanan immünolojik durumdur. Hastaların yaklaşık %25'inde tanı anında vardır ve hastalık seyri boyunca bu oran %50'lere çıkmaktadır (41). Erken evre hastalığı olanlarda ve alkileyici ajanlarla tedavi edilenlerde enfeksiyonlar için ciddi bir risk oluşturur. Özellikle kapsüllü bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlara yatkınlık meydana getirmektedir (42).

Hücre döngüsü, apoptoz, DNA tamiri gibi hücresel süreçler ve bu süreçlerle bağlantılı genetik anomalilerin, KLL gelişimine katkısı bulunmaktadır. KLL'de

genetik anomaliler genellikle tanı anında vardır. Ancak bir bölümü de tanı sonrası dönemde ortaya çıkabilir (43). Hastalarda del(13q), trizomi 12, del(17p) ve del(11q) varlığı rutin olarak araştırılmaktadır ve hastaların %80'inde bu mutasyonlardan en az biri tespit edilmektedir. Del(13q) %50-60 oranla en sık görülen anomalidir (44–46).

KLL'de lösemik hücreler, ortak B hücre belirteçleri ile antijen için B hücresi reseptörü (BCR) olan monoklonal membran immünglobulini içerir (47,48) BCR; büyüme, diferansiyasyon, adezyon ve migrasyon gibi birçok hücresel süreç üzerinde etkilidir. IGHV mutasyonu da BCR aktivasyonu üzerinde etkilidir (49,50) Mutasyona uğramamış IGHV'de BCR aktivasyonu artmışken, mutasyona uğramış IGHV'de azalmıştır.

Hastaların çoğunda, bir protoonkogen olan ve apoptozu baskılayan B hücreli lösemi/lenfoma 2 (BCL-2) gen ekspresyonunun arttığı rapor edilmiştir (51,52). BCL-2 ekspresyonundaki artışın, del(13q) ve tümör mikroçevresindeki değişiklikler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (52,53).

Hastalığın ilerlemesiyle birlikte DNA tamir genlerinde mutasyonlar meydana gelir. TP53 geni ve ATM geni hücresel stres veya DNA hasarı durumlarında aktive olur. Hücre siklusunun durdurulması, DNA onarımı, genomik stabilite, apoptoz, otofaji gibi çok sayıda komplike hücresel olayla ilişkilidirler (54–60). TP53 geni, 17. kromozomun p kolunda, ATM geni 11. kromozomun q kolunda yer alır. Del(17p) sebebiyle TP53 mutasyonu, del(11q) sebebiyle de ATM mutasyonu gelişir. Bu mutasyonlar neticesinde DNA'daki hasarın tamiri gerçekleştirilemez.

2.1.5. Klinik Bulgular

KLL'de klinik seyir oldukça değişkendir. Tanı sonrası hastaların bir kısmı asemptomatik olup, uzun yıllar hastalıkta ilerleme olmadan yaşayabilir. Bir kısmı ise tanı anında ileri evredir ve hızlı ilerleme eğilimindedir (61). İlk başvuru sıklıkla, rutin yapılan bir tam kan sayımında rastlantısal olarak tespit edilen lenfositozla olur. Daha az sıklıkta ise ağrısız LAP ilk başvuru nedenidir.

LAP ve hepatosplenomegaliye bağlı karında şişkinlik hissi ve erken doyma; hipogamaglobulinemiye bağlı enfeksiyonlar görülebilir. Otoimmün komplikasyonlar nedeniyle hemolitik anemi ve trombositopeni gözlemlenebilir. Anemiye bağlı çabuk

yorulma, cilt renginde solukluk, dispne, egzersiz intoleransı; trombositopeniye bağlı burun kanaması, diş eti kanaması, kanlı balgam, vücutta kolay morarma ilk semptom olabilir (62,63). Hastaların sadece %5-10'luk bir kısmı lenfomanın klasik B semptomları olarak adlandırılan; son 6 ayda %10'dan fazla kilo kaybı, 2 haftadan uzun süre devam eden enfeksiyon ilişkisiz ateş ya da gece terlemesi ile hekime başvurmaktadır (63).

Fizik muayenede en sık görülen bulgu LAP'dır. Çeşitli serilerde görülme sıklığı %50-90 arasında değişmektedir (64,65). Lenf nodları palpasyonda sıkı, yuvarlak, ağrısız ve mobil olarak ele gelir. Lokalize veya generalize olabilir. En sık servikal, supraklavikular ve aksiller lenf nodları etkilenir. Bazen, aynı anatomik bölgedeki lenf nodları birleşerek konglomere LAP denilen büyük lenfoid kitleler oluşturabilir.

Dalak en sık büyüyen ikinci lenfoid organdır, hastaların %25-55'inde splenomegali tespit edilir (64,65). Palpasyonda ağrısız, sınırları düzgün ve yapısı homojendir.

Hepatomegali olguların %15-25'inde görülür (64,65). Fizik muayenede sağ kosta sınırın altında 2-6 cm arasında ele gelir. Yüzeyi düzgündür ve hassasiyet yoktur.

Lenfoid olmayan organlar içinde en sık tutulum cilttedir. KLL'ye özgü cilt tutulumları lösemi kutis olarak adlandırılır. Hastaların %5'ten azında vardır. Makül, papül, plak, nodül, ülser veya kabarcık şeklinde ortaya çıkabilir, genellikle yüzde rastlanır (66). Tanı, deri biyopsisi yapılarak doğrulanabilir. Richter transformasyonuna eşlik etmediği sürece prognoza önemli bir etkisi yoktur.

Vücuttaki diğer lenfoid dokularda da tanı anında büyüme tespit edilebilir. Gastrointestinal mukoza ve meninks tutulumu çok nadir görülür (67,68). Nadir de olsa böbrekte paraneoplastik olarak; membranoproliferatif glomerülonefrit, minimal değişiklik hastalığı ve amiloidoz görülebilmektedir (69).

2.1.6. Laboratuvar Bulguları

KLL'nin en önemli laboratuvar bulgusu periferik kanda ve kemik iliğinde lenfositöz tespit edilmesidir. KLL tanısı için mutlak B lenfosit sayısı $>5000/\text{microL}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$) olması yeterlidir ancak, hastaların önemli bir kısmında başvuru anında

100.000/microL ($100 \times 10^9/L$) kadar yüksek değerlere rastlanmaktadır. Lenfosit sayısının $>400.000/microL$ ($100 \times 10^9/L$) ise, nadiren hiperviskoziteye bağlı iskemik atak, inme gibi komplikasyonlara neden olabilir (70). Bazı hastalarda tanı anında sitopeni (anemi, trombositopeni ve/veya nütropeni) görülebilir ve bu sitopeniler; otoimmün hemolitik anemi (OİHA), saf kırmızı hücre aplazisi (PRCA), otoimmün trombositopeni veya agranülositoz ile ilgili olabilir. KLL'li hastalarda OİHA görülme sıklığı artmıştır. Direkt coombs testi, vakaların %35'inde hastalığın herhangi bir döneminde pozitif olabilir. Belirgin OİHA, %10 olguda ortaya çıkar (71). PRCA, KLL'nin nadir görülen bir komplikasyonudur. Hastaların yaklaşık %0,5'inde görülür. Fakat hastalar kemik iliği aspirasyonu ve mutlak retikülosit sayısı ile değerlendirilirse bu oran %6'ya kadar çıkabilmektedir (71). PRCA genellikle hastalığın erken dönemlerinde ortaya çıkarken, OİHA daha çok geç dönemlerde görülür. İTP (immün trombositopenik purpura), hastaların %2-3'ünde ortaya çıkar (71). Trombosit antijenlerine karşı üretilen otoantikordardan kaynaklanır. Bazı hastaların ilk prezentasyonu İTP şeklinde olur. Agranülositoz görülme sıklığı, yaklaşık %0,5'tir.

Hipogamaglobulinemi, tanı sırasında yaklaşık %25 oranında vardır (41). Genellikle IgG, IgA ve IgM birlikte azalır. Ciddi hipogamaglobulinemi ve nütropeni varlığında hastalarda bakteriyel enfeksiyonlara yatkınlık oluşabilir (42). Hastaların yaklaşık %15'inde poliklonal gamaglobulin artışı görülürken, yaklaşık %5'inde monoklonal protein tespit edilir (72).

Biyokimyasal tetkiklerde KLL için spesifik bir parametre yoktur. Fakat, başlangıç tedavisi olarak fludarabinli rejimler alan hastalarda tedaviye yanıtın araştırıldığı bir çalışmada ileri evre KLL hastalarının %60'ında β_2 -mikroglobulin ve LDH seviyeleri yüksek bulunmuştur (73). Tümör yüküyle bağlantılı olarak ürik asit düzeyinde ve karaciğer fonksiyon testlerinde artış görülebilir.

2.1.7. Tanı

Erişkin bir kişide mutlak lenfositöz saptanması , KLL'den şüphelendirmelidir. Ayrıntılı tam kan sayımı, periferik kandan lenfositlerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için yapılan periferik yayma, lenfositlerin immünofenotipik özelliklerinin belirlenmesi için yapılan akım sitometrik inceleme tanı için yeterlidir (74).

Tanı için Uluslararası KLL Çalışma Grubu'nun (IWCLL) 2018 güncellemesi kullanılır ve aşağıdaki kriterlerin ikisinin de karşılanması gereklidir (74):

1- En az 3 ay boyunca; periferik kandaki mutlak B lenfosit sayısının $\geq 5000/\mu\text{l}$ olması ve periferik yaymada bu lenfositlerin çoğunun olgun görümlü küçük lenfositlerden oluşması

2- Periferik kanın akım sitometrik incelemesi ile B lenfositlerin klonalitesinin gösterilmesi

Mutlak lenfosit sayısı $< 5000/\mu\text{l}$ ve klonal B lenfosit saptanan hastalar aşağıdaki gibi sınıflandırılır:

1- Hastalık belirtilerinin hiçbiri olmayan hastalara MBL tanısı konur.

2- Tipik KLL hücreleriyle beraber, kemik iliği infiltrasyonuna bağlı bir veya daha fazla sitopenisi olan hastalara, periferik kandaki mutlak lenfosit sayısı veya LAP varlığına bakılmaksızın KLL tanısı konur.

3- Lenf nodu, dalak veya diğer ekstramedüller tutulumu olan ve kemik iliği infiltrasyonuna bağlı sitopenisi olmayan hastalara SLL tanısı konur. SLL tanısı lenf nodu biyopsisi ve histopatolojik değerlendirme ile doğrulanmalıdır.

KLL hastalarının periferik kan yaymasında en dikkat çekici bulgu lenfositozdur. Lenfositler küçük, yoğun kromatinli, dar sitoplazmalı ve tek tiptir. Yayma sırasında lenfositlerin parçalanması sonucunda meydana gelen "smudge cell, basket hücresi" denilen parçalanmış lenfositler görülür. Hastaların periferik kanında büyük, gevşek kromatine sahip, tek çekirdekçikli ve bazofilik sitoplazmalı prolenfositler de olabilir ancak bunların oranı %55'i geçmemelidir (74,75).

KLL hücreleri akım sitometri incelemesinde; kappa veya lambda hafif zincirinden birini, B hücre yüzey belirteçleri (CD19, CD20 ve CD23) ve T hücre yüzey belirteci olan CD5 ekspres eder. Yüzey immüoglobulin, CD20 ve CD79b normal B lenfositlere göre daha düşük ifade edilir. (35). Mutasyona uğramamış IGHV ekspresyonu olan KLL hücrelerinde zeta ilişkili protein-70 (ZAP-70) ve CD38 ekspresyonunun fazla olduğu görülmektedir (74)

Kemik iliği değerlendirmesi, tanı için gerekli değildir. Fakat sitopenisi olan

hastalarda ayırıcı tanı ve doğrulama amacıyla kemik iliği biyopsisi yapılabilir. Özellikle sitotoksik ajanlarla tedaviye başlanmadan önce kemik iliği biyopsisi yapılması önerilmektedir. Tedaviden sonra devam eden sitopeni varlığında, KLL infiltrasyonu ile tedavi ilişkili sitopeni ayırımında faydalıdır (76).

2.1.8. Ayırıcı Tanı

Periferik kanda lenfositöz yapan tüm durumlar ayırıcı tanıya girer. Bunlar içinde; enfeksiyonlar (enfeksiyöz mononükleozis, boğmaca, toksoplazmozis), prolenfositik lenfoma (PLL), mantle hücreli lenfoma (MCL) lösemik fazı, lenfoplazmositik lenfoma (LPL), saçlı hücreli lösemi (HCL), foliküler lenfoma (FL), splenik marjinal zon lenfoma (SMZL) ve MBL bulunur.

Hastaların ilk başvuru sebepleri, ayrıntılı öykü, fizik muayenede LAP ve/veya organomegali varlığı, tam kan sayımında lenfositöz ve sitopeni olup olmaması, lenfositlerin morfolojik yapıları, akım sitometri incelemesinde belirlenen immünofenotipik özellikler, ihtiyaç duyulan durumlarda lenf nodu biyopsisi ve kemik iliği biyopsisi ayırıcı tanı için önemlidir.

PLL, lenfositöz ve splenomegali ile beraber periferik kanda prolenfositlerin bulunması ile KLL'ye benzer. Prolenfositlerin %55 ve üstünde olması PLL lehinedir.

MCL, KLL'ye benzer şekilde lösemik dönemde kliniğe yansıyabilir. MCL ve KLL hücreleri, CD5 ve CD20'yi birlikte eksprese eder. Olguların çoğunda MCL hücreleri, siklin D1 için güçlü pozitif boyanır, yüksek düzeyde sIg ve CD20 eksprese ederken, CD23 eksprese etmez. KLL hücreleri ise, siklin D1 için negatiftir ve sıklıkla CD23 pozitifliği görülür. MCL'nin t(11;14) pozitifliği ayırıcı tanıda kullanılabilir.

Tablo 1. KLL Ayırıcı Tanısında Klasik İmmünofenotipler (77–79)

	CD5	CD10	CD19	CD20	CD23	CD25	CD103	CD200	sIg
KLL	+	-	+	S	+	+/-	-	+	S
B-PLL	-	-	+	B	-/+	-	-	-	B
MCL	+	-	+	B	-	+/-	-	-	B
LPL	-/+	-/+	+	+	+/-	+/-	-	+	+V
HCL	-	-	B	B	-	+	+	+	+
Varyant HCL	-	-	B	B	-	-	+	-	+
FL	-	+	+	+	+/-	-	-	-	+
SMZL	-/+	-	+	B	-/+	+/-	-	-	+B

*sIg: Yüzeysel immünooglobulini, V: Variable (Değişken)

*Normal B lenfosit ile ekspresyon düzeyleri kıyaslandığında B: belirgin/artmış, S: soluk/azalmış ekspresyon

*+/-: çoğu vaka antijeni eksprese etmekte, -/+ : çoğu vaka antijeni eksprese etmemekte

*KLL: Kronik lenfositik lösemi, B-PLL: B hücreli prolenfositik lösemi, MCL: Mantle hücreli lenfoma, LPL: Lenfoplazmositik lenfoma, HCL: Saçlı hücreli lösemi, FL: Foliküler lenfoma, SMZL: Splenik marjinal zon lenfoma

LPL'de periferik kan tutulumuna KLL'den daha az rastlanır ve dolaşımdaki malign hücreler genellikle plazmasitoid görünümündedir. LPL; CD23 ekspresyonu olmaması, yüzeysel IgM ve CD20 için güçlü pozitif boyanması, sitoplazmik Ig varlığı ve akım sitometride bariz plazma hücre diferansiasyonunun bulunması ile KLL'den ayrılır.

MBL'de LAP, organomegali ve sitopeni olmaksızın klonal B lenfosit sayısı 5000/ µl'nin altındadır ve akım sitometri ile klonalitenin gösterilmesi gerekir (6,7)

2.1.9. Sitogenetik ve Moleküler Genetik

KLL hastalarının periferik kandaki lenfositleri, FISH (Floresan in-situ hibridizasyon) analizi ile interfaz döneminde incelendiğinde %82 oranında sitogenetik anomali tespit edilmiştir (44). En sık delesyon, 13. kromozomun uzun kolunda görülen del (13q)'dur. Bunun dışında sık karşılaşılan diğer kromozomal değişiklikler; trizomi 12, 11. kromozomun uzun kolunda görülen del (11q) ve 17. kromozomun kısa

kolunda görülen del (17p)'dir.

Del (13q), KLL olgularının yarısından fazlasında görülmektedir. Delesyona maruz kalan bölgede, apoptoz ve hücre siklusunda rol alan bazı miRNA'lar bulunmaktadır (76). Bu miRNA'ların yokluğunda BCL-2 ekspresyonu artar ve KLL hücreleri, stres sinyallerine uygun apoptotik yanıt veremezler (80).

Trizomi 12, KLL olgularının yaklaşık %16'sında görülür. RUNX3 geninin aşırı ekspresyonuyla bağlantılıdır. RUNX3 geninin, onkogen ve tümör supresör gen ekspresyonlarının regülasyonunda önemli rolü vardır (81).

Del(11q), KLL vakalarının %15-20'sinde tanı anında mevcuttur ve yüksek riskli bir sitogenetik değişiklik olarak kabul edilir. Delesyon bölgesi ATM (Ataksi-telenjiektazi) genini içerir. ATM geni; p53 tümör supresör geninin fosforilasyonunu sağlar ve hücre siklusunun hatasız devam etmesini sağlamada çok önemlidir. KLL hücrelerinin ATM fonksiyonu bozulduğunda, kemoterapinin neden olduğu DNA hasarına uygun şekilde karşılık veremezler (82).

Del(17p), öncesinde kemoterapi almayan hastaların %5-8'inde bulunur ve delesyona uğrayan bölge TP53'ü içerir. TP53 önemli bir tümör supresör gendir ve DNA hasarı tespit edildiğinde apoptozu indükler. Del(17p) mutasyonu olan KLL vakaları, genotoksik kemoterapilere karşı belirgin direnç gösterir (83).

IGHV gen mutasyonu KLL hastalarının yaklaşık yarısında görülmektedir. Mutasyonlu vakalar genellikle yavaş, mutasyonsuz vakalar ise hızlı gidişlidir. Mutasyona uğramamış IGHV genlerinin varlığında, tedavi sonrası nüks riskinin daha yüksek olduğu ve dolayısıyla düşük sağkalım ile ilişkili olduğu bilinmektedir (84).

2.1.10. Klinik Evreleme

KLL'nin klinik evrelemesi Rai ve Binet sistemleri ile yapılır. Bu evreleme sistemlerinde fizik muayene ve tam kan sayımı kullanılır. Hastalar düşük, orta ve yüksek riskli olarak sınıflandırılarak, tahmini yaşam süresi ve tedaviden fayda görme ihtimalleri değerlendirilir.

2.1.10.1. Rai Evreleme Sistemi

Rai evreleme sistemi hastalığı fizik muayene ve tam kan sayımına göre 5 evreye ayırır. Fakat prognostik grup sayısının düşürülmesi amacıyla Rai evreleme sistemi modifiye edilmiştir (64). Modifiye Rai evrelemesi, hastaları düşük, orta ve yüksek riskli olarak sınıflandırır. Sadece lenfositöz varsa düşük riskli olarak tanımlanır. Lenfositöze LAP ve/veya organomegali (splenomegali/hepatomegali) eşlik ediyorsa orta riskli şekilde adlandırılır. Yüksek riskli grupta ise hastalarda anemi (hgb <10 g/dl) ve/veya trombositopeni (trombosit sayısı <100.000/mm³) vardır (74).

Tablo 2. Rai Evreleme Sistemi

Rai Evreleme Sistemi	Modifiye Rai Evrelemesi	Özellik
Evre 0	Düşük risk	Lenfositöz
Evre 1	Orta risk	Lenfositöze eşlik eden LAP
Evre 2	Orta risk	Lenfositöze eşlik eden splenomegali veya hepatomegali
Evre 3	Yüksek risk	KLL ilişkili anemi (hgb<10 gr/dl)
Evre 4	Yüksek risk	KLL ilişkili trombositopeni (trombosit sayısı<100.000/mm ³)

2.1.10.2 Binet Evreleme Sistemi

Binet evreleme sistemi, 1 cm'den büyük lenf nodu tutulumu olan bölge sayısı, organomegali, anemi ve/veya trombositopeni varlığı temel alınarak geliştirilmiş bir evreleme sistemidir. Tutulan bölgeler; baş-boyun, aksilla, inguinal bölge, dalak ve karaciğer şeklinde beş bölge olarak gruplandırılmıştır (65).

Tablo 3. Binet Evreleme Sistemi

Evre	Özellik
Evre A	hgb \geq 10 g/dL, trombosit \geq 100 \times 10 ⁹ /L, 2 veya daha az bölge tutulumu
Evre B	hgb \geq 10 g/dL, trombosit \geq 100 \times 10 ⁹ /L , 3 ve/veya daha fazla bölge tutulumu veya organomegali
Evre C	hgb<10 g/dL ve/veya trombosit<100 \times 10 ⁹ /L

2.1.11. Prognoz

KLL hastalarında klinik tablo, çok farklı seyredebilir. Teşhis konulmasından sonraki sağkalım süreleri 2 ile 20 yıl arasında değişmektedir. Ortalama yaşam süresi yaklaşık olarak 12 yıldır. Prognozun en önemli belirleyicisi hastalığın evresidir. Rai evreleme sistemine göre tahmin edilen ortalama yaşam süreleri; evre 0'da >150 ay, evre I'de 101 ay, evre II'de 71 ay, evre III ve IV'te 19 aydır (64). Binet evreleme sistemine göre tahmin edilen ortalama yaşam süreleri ise; evre A'da kendi yaş grupları ile benzer, evre B'de 84 ay, evre C'de 24 aydır (65). Evrenin artışı, daha kısa yaşam süresi ile ilişkilidir. Modern tedaviler ile günümüzde beklenen sağkalım süreleri artış göstermiştir.

Tedavide son yıllarda yeni seçeneklerin ortaya çıkması, prognozun belirlenmesinde Rai ve Binet evrelemeleri ile beraber genetik ve kromozomal analizleri ön plana çıkarmıştır. Del(13q) mutasyonuna sahip vakaların klinik seyri daha yavaşken , del(17p) ve TP53 mutasyonunun prognoz, sağkalım ve kemoterapi yanıtına etkisi kötüdür (85). Del(11q) mutasyonu olan vakalarda da, hızlı progresyon ve sağkalımın azaldığı görülmüştür (86).

IGHV gen mutasyonunun olması, KLL hücrelerinin apoptozunu kolaylaştırdığı için iyi prognostik faktör olarak kabul edilir. Mutasyona uğramamış IGHV geni varlığında ise, CD38 ve ZAP-70 ekspresyonu artar. Bu durum daha ileri klinik evre, progresyonun hızlı olması, tedaviye kötü yanıt ve sağkalımın azalması ile ilişkilidir (87).

LDT (Lenfosit Doubling Time), 1 yıldan kısa olan KLL olgularının daha şiddetli seyrettiği, tersine uzun LDT'ye sahip olguların ise hafif bir klinik tablo oluşturduğu görülmektedir (88).

β_2 -mikroglobulin düzeyleri KLL hastalarında, evre ve tümör yükü ile ilişkilidir. Yüksek düzeyler kötü prognoza işaret eder (89). LDH yüksekliği de kötü prognoz göstergesidir ve artmış LDH seviyeleri Richter transformasyonunu akla getirmelidir (90).

DNA sentezinde görevli olan timidin kinazın serumda yüksek olmasının; hızlı progresyon, kısa LDT ve mutasyona uğramamış IGHV geni ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (91)

Kemik iliği biyopsisinin rutin olarak yapılmasına gerek yoktur ancak kemik iliği tutulum şekli prognoz hakkında bilgi vermektedir. Diffüz tutulum paterninin progresif seyirle, interstisyel ve nodüler tutulum paterninin ise yavaş seyirle ilişkili olduğu gösterilmiştir (92).

Akım sitometride CD49d ekspresyonunun yüksek tespit edilmesi ve serumda VEGF (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü) düzeyinin artmış olması da kötü prognozu gösteren özelliklerdendir (93,94). İleri yaş, kötü performans durumu, ciddi komorbidite varlığı da kötü prognozla ilişkilidir.

Tablo 4. KLL’de prognoz üzerine etkili genetik risk faktörleri (95)

Genetik Parametreler	Prognoz
Del (17p) ve/veya p53 mutasyonu	Yüksek risk
Del (11q)	Orta-yüksek risk
Trizomi 12	Orta risk
Del (13q)	Düşük risk
NOTCH1 mutasyonu*	Orta-yüksek risk
SF3B1 mutasyonu*	Orta-yüksek risk
BIRC3 mutasyonu*	Yüksek risk

*Zorunlu olmayan ancak gelişmiş merkezlerde önerilen moleküler parametreler

KLL uluslararası prognostik indeksinde (KLL-IPI), 5 tane bağımsız prognostik faktör kullanılır. TP53 delesyonu ve/veya mutasyonu, IGHV mutasyon durumu, serum β_2 -mikroglobulin, klinik evre ve yaşa göre 5 yıllık sağkalımın değerlendirildiği dört farklı kategori belirlenir.

Tablo 5. KLL-IPI skortlama sistemi (95)

Parametre	Puanlama
Yaş	≤ 65 yaş: 0 puan, >65 yaş: 1 puan
Klinik evre	Binet A/Rai 0: 0 puan Binet B-C/Rai I-IV: 1 puan
β_2 -mikroglobulin düzeyi (mg/L)	$\leq 3,5$: 0 puan, $>3,5$: 1 puan
IGHV mutasyon durumu	Var: 0 puan, Yok: 2 puan
Del (17p) ve/veya p53 mutasyonu	Yok: 0 puan, Var: 4 puan

Tablo 6. KLL-IPI sınıflamasına göre risk grupları ve sağkalım oranları (95)

Puan	Risk	5 yıllık sağkalım (%)
≤ 1	Düşük risk	93,2
2-3	Orta risk	79,3
4-5	Yüksek risk	63,3
≥ 6	Çok yüksek risk	23,3

2.1.12. Tedavi

2.1.12.1. Tedavi Endikasyonları

Bütün KLL hastalarında tanı konulduğu anda tedavi endikasyonu yoktur. Tedavi edilmeden normal popülasyonla aynı sağkalım oranlarına sahip hastaların olması, allojenik hematopoetik hücre transplantasyonu (HCT) haricinde, var olan diğer tedavi yöntemleriyle tam bir tedavi sağlanamaması, erken tedavi ile uzun süreli sağkalımda iyileşme görülmemesi, nadir de olsa takiplerde kendiliğinden gerileme

görülmesi gibi sebeplerle, erken evre ve asemptomatik KLL hastalarında tedavi başlanmamaktadır (96–99).

IWCLL Tedavi Başlama Kriterleri (74)

1- Anemi ve/veya trombositopeni gelişmesi veya progresif kemik iliği yetmezliği bulguları (Hemoglobin <10 gr/dL veya trombosit sayısı <100.000/microL genellikle tedavi endikasyonu olarak kabul edilir.)

2- Masif (kot altı 6 cm) veya ilerleyici veya semptomatik splenomegali

3- Masif (uzun aksında 10 cm) veya progresif veya semptomatik lenfadenopati

4- İki ayda lenfosit sayısında %50'den fazla artış olması veya <6 aylık LDT ile ilerleyici lenfositoz (Lenfositoz veya LAP'a neden olabilen enfeksiyon ve steroid kullanımı gibi durumlar dışlanmalıdır.)

5- Steroid veya diğer standart tedavilere iyi yanıt vermeyen otoimmün anemi ve/veya trombositopeni

6- Deri, böbrek, akciğer gibi organlarda semptomatik klinik veya ektranodal tutulum

7- Hastalığa bağlı semptomlar (6 ay içinde %10'dan fazla istemsiz kilo kaybı, ciddi yorgunluk, enfeksiyon kanıtı olmadan 2 haftadan uzun süren 38 °C üzerinde ateş veya 1 aydan uzun süren enfeksiyon kanıtı olmadan gelişen aşırı gece terlemesi)

Bariz şekilde yükselmiş lökosit sayısı ile başvuran hastalar olabilir fakat lökostatiz nadir görülür. Bu yüzden mutlak lenfosit sayısı tedaviye başlamak için tek kriter değildir. Aşırı lenfositoz (lökosit sayısı>400.000/microL), hiperviskozite sendromu riskinde artış ve buna bağlı geçici iskemik atak gibi komplikasyonlara neden olabilir. Erken evre KLL hastalarında lökosit sayısı 200.000-300.000/microL ise ve hiperviskozite bulguları varsa tedavi başlanması önerilebilir.

2.1.12.2. Tedavi Öncesi Değerlendirme

Hastalarda tedavi öncesinde yapılması gereken temel değerlendirmeler (74):

1- Öykü ve fizik muayene: B semptomları ve komorbid hastalıkların sorgulanması, servikal, aksiller ve inguinal bölgede LAP varlığı/boyutları, splenomegali ve/veya hepatomegali varlığı/boyutları

2- Performans durumunun ECOG skoru ile belirlenmesi

3- Tam kan sayımı : Lökosit sayısı, lenfosit sayısı ve oranı, hemoglobin, hematokrit, trombosit sayısı

4- Periferik kan yayması: Lenfositlerin morfolojisi, anemi ve/veya trombositopeni varlığı

5- Biyokimyasal analiz: Üre, kreatinin, transaminazlar, elektrolitler, alkalin fosfataz, bilirubin, LDH, β_2 -mikroglobulin, haptoglobin

6- Direkt coombs testi ve retikülosit sayısı: OİHA değerlendirmesi için

7- Serum immünoglobulin düzeyleri

8- HIV, Hepatit B ve C serolojisi: HIV ile enfekte hastalarda tedavide kullanılan ilaçların immünsupresif etkisi ve antiretroviral ilaçlarla beraber myelotoksik etkinin artması açısından dikkatli olunmalıdır. İmmünsupresif ajanlarla HBV ve HCV reaktivasyon riski arttığı için tedavi öncesinde değerlendirilmelidir. Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) pozitif olan hastalarda tedaviler genellikle antiviral ilaçlarla birlikte uygulanır.

9- CMV serolojisi: Alemtuzumab, idelalisib veya allojenik kök hücre nakli ile ilişkili tedavi rejimleri CMV reaktivasyonuna yol açabildiği için değerlendirilmeli ve gerekli ise CMV profilaksisi ile beraber tedavi başlanmalıdır (100,101).

10- Akım sitometri: Lenfosit immünofenotiplerinin tespiti

11- FISH ile sitogenetik incelemelerin yapılması: Özellikle periferik kanda del(17p), TP53, del(13q), del(11q), trizomi 12 mutasyonları değerlendirilmeli ve mantle zone lenfoma ayırıcı tanısı için t(11,14) istenmelidir.

12- Hiler ve mediastinel LAP açısından akciğer grafisi

13- Yüzeysel doku ve abdomen USG: Klinikte LAP ve organomegali açısından kullanılmaktadır ancak tedaviye yanıt değerlendirmesinde önerilmez.

14- Abdomen, pelvis ve toraks BT görüntülemeleri: Tedavi öncesi ve sonrasında evrelemenin tekrarı açısından önerilmektedir.

15- PET (Pozitron Emisyon Tomografi): İspatlanmış veya ciddi şüphelenilen Richter transformasyonu dışında kullanılması önerilmez.

16- Klinik gereklilik durumunda kemik iliği aspirasyon ve biyopsisi

17- Lenf nodu biyopsisi: Kesin tanı veya Richter transformasyonu varlığını göstermek için yapılır.

Tedaviye başlanmadan önce hastaya mutlaka bilgi verilmelidir. Devamlı/sabit süreli veya aralıklı tedavi rejimleri ile ilgili hastanın isteği sorulmalı, başlanacak ilaçlara özgü yan etkiler (myelosupresyon, enfeksiyonlar, kemoimmünoterapiye ikincil malignite riski, kardiyak toksisite, kanama riski, tümör lizis sendromu (TLS) ve otoimmün komplikasyonlar) konusunda aydınlatılmalıdır.

2.1.12.3. Birinci Basamak Tedaviler

Semptomatik veya ileri evre KLL hastaları (Rai III-IV, Binet C) için başlangıç tedavisi planlanırken; hastanın yaşı, performans durumu, ek hastalıklarının varlığı, hastalığın genetik özellikleri, hasta tercihi ve tedavi hedefleri göz önünde bulundurulur.

KLL'nin üzerinde fikir birliği sağlanan standart bir tedavisi yoktur. Genellikle tekli ya da kombinasyon şeklinde ajanlar kullanılır (83):

- Alkilleyici ajanlar (Klorambusil, siklofosamid, bendamustin)
- Pürin analogları (Fludarabin, pentostatin, kladribin)
- BTK inhibitörleri (İbrutinib, acalabrutinib)
- BCL-2 inhibitörü (Venetoklaks)

- Monoklonal antikorlar (Rituksimab, ofatumumab, obinutuzumab, alemtuzumab)

- Fosfatidilinozitol-3-kinaz (PI3K) inhibitörleri (Idelalisib, duvelisib, umbralisib)

Alkilleyici ajanlardan klorambusil düşük maliyet, düşük toksisite ve oral kullanım kolaylığı gibi sebeplerle altın standart tedavi olarak kabul görmüştü (96). Fakat tam yanıt oranının düşüklüğü ve uzun süreli kullanımdan sonra meydana gelen derin sitopeni, miyelodisplazi ve sekonder akut lösemi gibi yan etkileri nedeniyle günümüzde pek tercih edilmemektedir. İleri yaş hastalarda palyatif amaçlı ekonomik bir seçenek olarak değerlendirilebilir.

Pürin analoglarından fludarabin kullanan hastalar, klorambusil verilen hastalar ile karşılaştırıldığında progresyonsuz sağkalımın arttığı gözlenmiştir (102). Tekli kladribin tedavisi, klorambusil ve prednizolon kombinasyonu ile mukayese edildiğinde sağkalımı uzatmadığı ancak, tam remisyon cevabının daha fazla olduğu gözlenmiştir (103).

Tablo 7. Birinci Basamak Tedavi Alternatifleri (83)

Del(17p) veya TP53 mutasyonu	Performans	IGHV mutasyonu	Tedavi
Var	Önemsiz	Önemsiz	1.Ibrutinib/Acalabrutinib 2.Venetoklaks ve Obinutuzumab 3.İdelalisib-Rituksimab
Yok	İyi (ECOG<2)	Var	1.Genç hastalarda FCR, >65 yaş Rituksimab ve Bendamustin (RB) 2.Ibrutinib/Acalabrutinib 3.Venetoklaks ve Obinutuzumab
		Yok	1.Ibrutinib/Acalabrutinib 2.Venetoklaks ve Obinutuzumab 3.Genç hastalarda FCR, >65 yaş RB

	Kötü (ECOG ≥ 2)	Var	1. Venetoklaks ve Obinutuzumab 2. Ibrutinib/Acalabrutinib 3. Klorambusil ve Obinutuzumab
		Yok	1. Venetoklaks ve Obinutuzumab 2. Ibrutinib/Acalabrutinib 3. Klorambusil ve Obinutuzumab

Tedaviye başlamadan önce hastalar, sitogenetik analiz sonuçlarına göre sınıflandırılır:

1- Çok yüksek riskli hastalık: 17p delesyonu ve/veya TP53 mutasyonu olan hastaların, kemo-immünoterapi ile yapılan ilk tedaviye yanıt vermeme ya da remisyon sağlandıktan hemen sonra nüks etme riski vardır. Bu gruptaki hastalar için, yaştan bağımsız olarak kemo-immünoterapi yerine ilk tedavi seçeneği olarak hedefe yönelik tedaviler (ibrutinib, acalabrutinib veya venetoklaks bazlı tedaviler) önerilmektedir. Genç hastalarda progresyona kadar ibrutinib ve rituksimab kullanılabilir. Tüm yaş kategorilerinde progresyona kadar tek ajan ibrutinib/venetoklaks/acalabrutinib veya 1 yıl boyunca venetoklaks ve obinutuzumab tercih edilebilir. Bu grupta allojenik HCT, relaps/refrakter hastalığı olan, genç ve performansı kötü olmayan hastalar için iyi bir tercih olarak görülmektedir (104).

2- Yüksek riskli hastalık: IGHV'nın mutasyona uğramadığı (17p delesyonu veya TP53 mutasyonu olmayan) hastalara da kemo-immünoterapi yerine hedefe yönelik tedaviler önerilmektedir. Bütün hasta yaş gruplarında progresyona kadar tek ajan ibrutinib/acalabrutinib veya 1 yıl boyunca sabit süreli venetoklaks ve obinutuzumab kullanılabilir. Daha genç hasta popülasyonunda ise, progresyona kadar ibrutinib ve rituksimab veya acalabrutinib ve obinutuzumab tercih edilebilir.

3- Standart riskli hastalık: IGHV'nın mutasyona uğradığı (17p delesyonu veya TP53 mutasyonu olmayan) hastalarda, kemo-immünoterapi ya da hedefe yönelik tedavilerle progresyonsuz sağkalım oranları birbirine yakındır. Tüm yaş kategorilerinde tek bir ajan olarak ibrutinib/acalabrutinib; genç/orta yaş hasta gruplarında rituksimab veya obinutuzumab ile kombine şekilde ibrutinib, sabit süreli venetoklaks ve obinutuzumab; daha genç hasta gruplarında fludarabin, siklofosfamid

ve rituksimab (FCR) veya progresyona kadar acalabrutinib ve obinutuzumab; daha yaşlı gruplarda ise rituksimab ve bendamustin (RB) kullanılabilir.

Kreatinin klirensi (CrCl) normal, CIRS değeri (Cumulative illness rating scale) düşük, fiziksel performansı iyi olan ve 17p delesyonu veya TP53 mutasyonu olmadan mutasyona uğramış IGHV geni taşıyan hastalarda, FCR kemo-immünoterapisi uzun süreli remisyon sağlar (105). CIRS >6, CrCl <70 mL/dk, anlamlı karaciğer yetmezliği (Child-Pugh sınıf B veya C), ECOG PS ≥ 2 bulgularından en az birinin olduğu durumlarda ise kemo-immünoterapi önerilmez.

2.1.12.4. Relaps/Refrakter Olgularda Tedavi

Relaps/refrakter olgularda da standardize edilmiş bir tedavi rejimi yoktur. Nüks eden hastalara yaklaşım, hastanın fiziksel uygunluğuna ve remisyon süresine göre değişmektedir. Tedavi seçimi; 1. basamakta kullanılan ajan, o ajanla alınan cevap, cevabın süresi, görülen yan etkiler, hastanın performansı ve tercihleri göz önüne alınarak yapılır. İlk remisyon süresi 36 ayı geçenlerde 1. basamak tedavi tekrarlanabilir.

Son uygulanan tedaviye yanıt alınamayan ya da en son tedavi dozundan sonraki ilk 6 ay içinde nüks eden olgular, refrakter olarak kabul edilir. Tedavide kullanılan ajan mutlaka değiştirilmelidir. Refrakter kabul edilen vakalarda; venetoklaks ± rituksimab, ibrutinib/acalabrutinib tek başına veya venetoklaks ile kombine, acalabrutinib ve obinutuzumab, idealisib ve rituksimab, alemtuzumab tek başına veya deksametazon ile kombine, allojenik HCT alternatif tedaviler olarak yer alır.

Refrakter kabul edilen veya del(17p) mevcut olan, fiziksel olarak uygun hastalara, bruton kinaz inhibitörü ile nüks görülür ve ikinci bir rejimden yanıt alınırsa allojenik nakil önerilebilir (106). 1. basamakta hastaya kemo-immünoterapi uygulandıysa ve 36 aydan daha uzun sürede relaps gerçekleştiyse, 1.basamakta kullanılan ajan tekrar verilebilir veya hedefe yönelik tedaviye geçilebilir.

2.1.12.5. Hedefe Yönelik Ajanlar

Monoklonal Antikorlar: KLL tedavisinde kullanılan monoklonal antikorlardan rituksimab, ofatumumab, obinutuzumab CD20 üzerinden etki ederken; alemtuzumabın hedefi ise CD52'dir.

1.Rituksimab: CD20, olgun B hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen aktive ve glikozile edilmiş bir fosfoproteindir. Kemoterapi ile kombine rituksimab tedavisinin KLL'de çok etkili olduğu gösterilmiştir. Moleküler sitogenetiğin de içinde olduğu prognostik faktörlerin sistematik bir analizi, çoğu prognostik alt grup için uygulanan FCR kombinasyon tedavisinin olumlu etkisinin olduğunu göstermiştir. Fakat del(17p) mevcut olan hastalarda FCR'nin sağkalımı iyileştirmediği bilinmektedir (105). Rituksimab özellikle ileri yaş hastalarda bendamustin ile kombine edilerek etkili bir seçenek olarak kullanılmaktadır (107).

Tablo 8. Relaps/Refrakter Vakalarda Tedavi Alternatifleri (83)

1.Basamak tedaviye yanıt	Performans	Tedavi
Refrakter veya 3 yıl içinde progresyon	İyi (ECOG<2)	1.Venetoklaks+Rituksimab 2.İbrutinib/Acalabrutinib 3.İdelalisib+Rituksimab 4.Fludarabin+Alemtuzumab 5.FCR 6.RB 7.Venetoklaks (tek ajan) 8.Alemtuzumab+Deksametazon 9.Lenalidomid 10.Allojenik hematopoetik kök hücre nakli (HCT)
	Kötü (ECOG≥ 2)	1.Venetoklaks+Rituksimab 2.İbrutinib/Acalabrutinib 3.İdelalisib+Rituksimab 4.Alemtuzumab 5.RB 6.Lenalidomid 7.Ofatumumab 8.Yüksek doz rituksimab

3 yıldan sonra progresyon	Tümü	1.Birinci basamak tedavi tekrarı düşünülebilir. 2.Daha önce kemoterapi verildiyse hedefe yönelik tedaviler verilebilir.
---------------------------	------	--

2. Ofatumumab: B hücreleri yüzeyinde eksprese edilen CD20 üzerindeki tek bir epitopy hedef alır. Rituksimab ile karşılaştırıldığında daha fazla kompleman bağımlı sitotoksosite (CDC) ve yaklaşık aynı oranda antikör bağımlı sitotoksosite (ADCC)'ye yol açarak hücre ölümü gerçekleştirir (108).

3. Obinutuzumab: Anti-CD 20 etkinliği olan bir tip 2 antikördür. Fc bölgesi glikozile edilmiştir. Rituksimabtan farklı olarak hedef moleküle daha dikey olarak bağlanır ve rituksimaba oranla daha fazla hücre ölümü ve ADCC'ye sebep olduğu gösterilmiştir. Relaps/refrakter KLL hastalarında tekli obinutuzumab tedavisinin değerlendirildiği bir çalışma, obinutuzumabın KLL'de etkili bir ajan olduğunu göstermiştir (109). Rituksimab ile kıyaslandığında obinutuzumab tedavisiyle daha fazla sağkalım gerçekleştiği ortaya konmuştur (110).

4. Alemtuzumab: CD52 antijenine karşı geliştirilen monoklonal antikördür. CD52, hem sağlıklı hem de malign hematopoetik hücrelerde eksprese edilmektedir. Alemtuzumab, CD52' ye bağlandıktan sonra CDC, ADCC ve apoptoz gibi mekanizmalar üzerinden hücre ölümü sağlamaktadır. Kötü prognostik özellikleri olan hastalarda da etkili olmasına rağmen, tedavide yeni oral ajanların kullanıma girmesiyle alemtuzumab tercih edilmemektedir.

Bruton tirozin kinaz (BTK) inhibitörleri: BTK, B hücresinin hayatta kalma yollarını aktive eder. Bu yollar, BCR'nin sinyal aktarımında da görevlidir. Günümüzde B hücreli malignitelerin tedavisinde, BTK inhibitörlerinin önemi artmıştır.

1. İbrutinib: Apoptozu uyarıcı, oral olarak aktif ve küçük moleküllü bir BTK inhibitörüdür. BTK enzimini irreversibl şekilde inhibe ederek, KLL hücrelerinin çoğalmasının ve canlı kalmasının önüne geçer. İbrutinib ile tedavi edilen hastaların uzun süreli takibiyle yapılan klinik çalışmalarda, kardiyovasküler yan etkiler

görülmüştür. Özellikle atriyal fibrilasyon (AF) başta olmak üzere kardiyak aritmi, kalp yetmezliği, kanama ve hipertansiyon (HT) riskinde artış dikkati çekmektedir (111,112). Bu komplikasyonlar, ibrutinibin çoklu kinaz inhibisyonuna dayanmaktadır. AF görülen hastalarda terapötik antikoagülasyon gerekir. Bu da kanama riskini artırır. Bu kardiyak toksisite, sıklıkla AF ile ilişkili olup, tromboembolizm veya akut miyokard enfarktüsü ile ilişkili değildir (113).

2. Acalabrutinib: İbrutinibe göre daha seçici etki eden ve oral olarak kullanılabilen BTK inhibitörüdür. Relaps KLL vakalarında etkinliği ibrutinible benzerdir. En sık görülen yan etkiler; ishal, baş ağrısı, pnömoni, HT ve anemidir. AF ve kanama sorunlarıyla ibrutinibe göre daha az karşılaşılır (114).

BCL-2 inhibitörleri: BCL-2 proteini KLL hücrelerinde bol miktarda ekspres edilir ve bu hücrelerin canlı kalmasına yol açar. Venetoklaks, BCL-2 proteinini inhibe ederken, proapoptotik proteinleri aktive eder. Böylece apoptozu indükler. Yapılan çalışmalar; tekli venetoklaks tedavisinin del(17p) mevcut olan hastalar da dahil olmak üzere, relaps/refrakter KLL hastalarında etkin olduğu ve iyi tolere edildiği görüşünü desteklemektedir (115,116). Diğer kötü prognostik özelliklere sahip hasta gruplarında da benzer olumlu etkiler görülmüştür.

AF öyküsü, orta dereceli karaciğer yetmezliği, şiddetli kanama öyküsü gibi komorbiditeleri olan ve antikoagülan kullanımı gibi nedenlerle ibrutinib kullanımının kısıtlı olduğu hastalarda venetoklaks ve obinituzumab kombinasyonu tercih edilebilir (117). Yüksek riskli ve ileri yaş hastalara venetoklaks ile ibrutinib kombine edilerek uygulandığında da etkili sonuçlar alınmıştır (118).

PI3K inhibitörleri: İdelalisib, oral kullanılan, KLL hücrelerinde apoptozu uyaran, PI3K δ -izoformunun seçici inhibitörüdür. Normal T ve NK hücrelerinde apoptozu etkilemez ve ADCC'yi azaltmaz. İdelalisible yapılan bir çalışmada, kötü prognostik özellikler içeren relaps/refrakter KLL olgularında etkili olduğu görülmüştür. Pnömoni, nötropenik ateş ve ishal gibi yan etkilerle karşılaşmıştır (119).

KLL tedavisi için geliştirilen yeni ajanlarda, tercih önceliği ve kombinasyon önerileri netleşmemiştir. 683 hastayla yapılan çok merkezli bir çalışmada; ilk kinaz inhibitörü olarak ibrutinib kullanıldığında, daha uzun progresyonsuz sağkalım

sağladığı ve idelalisibe göre üstün olduğu gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada; ibrutinib ile yanıt alınamayan olgularda venetoklaks kullanılmasıyla, hem idelalisib hem de kemoimmünoterapiden daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (120).

Yeni geliştirilen ajanlarla farklı hasta popülasyonlarında yeterli mukayeseli çalışmanın olmayışı, randomize kontrollü faz 3 çalışmaların eksikliği gibi nedenlerle, hedefe yönelik tedavilerde kesinleşmiş kullanım stratejileri henüz belirlenememiştir.

2.1.12.6 Tedaviye Yanıtın Değerlendirilmesi

Yanıt değerlendirme, 2018 IWCLL kılavuzunun önerisine göre, tedavi bitiminden en az iki ay sonra yapılmalıdır. Fizik muayene, kan tetkikleri ve kemik iliği analizi kullanılır. Tedavi yanıtı; tam yanıt (komplet remisyon-CR), kısmi yanıt (parsiyel remisyon-PR), stabil hastalık (SD), progrese hastalık (PD) olarak sınıflandırılır.

Tam yanıt (CR): Aşağıdaki tüm ölçütler sağlanmış olmalıdır:

- Hastalığa bağlı konstitüsyonel bulguların yokluğu
- Fizik muayenede 1,5 cm'den büyük lenf nodu olmaması
- Fizik muayenede splenomegali ve/veya hepatomegali saptanmaması
- Periferik kanda; lenfosit sayısının $<4 \times 10^9/L$, nötrofil sayısının $\geq 1500 \times 10^9/L$, trombosit sayısının $\geq 100 \times 10^9/L$, eritrosit süspansiyonu desteği verilmeksizin hemoglobinin >11 g/dL olması

CR yanıt lehine klinik ve laboratuvar verileri varsa, son tedaviden en az 2, en fazla 6 ay sonra kemik iliği biyopsisi ve aspirasyonu ile doğrulama önerilmektedir. Kemik iliği analizinde, KLL hücrelerinin olmaması ve hastanın yaşına göre normosellüler bir kemik iliği beklenir.

Minimal rezidüel hastalık (MRD): CR yanıt alınan hastalarda; hassas çok parametrelili akım sitometri, PCR veya yeni nesil yüksek verimli dizileme kullanılması ile MRD tespit edilebilir. Bu şekilde kan veya kemik iliğinde yapılan malign klon taramasında her 10.000 lökositte <1 KLL hücresi olması MRD negatif olarak adlandırılır (121). Yapılan çalışmalar, MRD'yi yok eden tedavilerden daha iyi klinik

sonuç elde edildiğini göstermektedir(122,123). Periferik kanda MRD negatif tespit edildikten sonra, MRD açısından kemik iliği incelemesi de mutlaka yapılmalıdır.

Kısmi yanıt (PR): Tümöral yük ve klinikle ilgili en az 2 ölçüt ve hematolojik parametrelerden en az 1 ölçüt sağlanmalıdır:

Tümöral yük ve klinikle ilgili olanlar:

- Fizik muayenede, büyüyen lenf nodu boyutunda \geq %50 azalma olması, lenf nodu boyutlarının artmaması ve yeni gelişen \geq 1,5 cm lenf nodu olmaması (Değerlendirmede 6 taneye kadar lenf nodlarının uzun çapları toplanarak tedavi öncesi ve sonrası karşılaştırılır. Boyutu <1,5 cm olan ve boyut artışı <%25 olan lenf nodları anlamlı kabul edilmez.)

- Fizik muayenede karaciğer ve/veya dalak boyutunun \geq %50 azalması
- Periferik kandaki lenfosit sayısının tedavi öncesine göre \geq %50 azalması

Hematolojik parametreler:

- Trombosit sayısı $>100 \times 10^9$ veya tedavi öncesine göre $>$ %50 düzelme olması
- Eritropoetin veya eritrosit süspansiyonu desteği verilmeden hemoglobin >11 g/dL veya tedavi öncesine göre $>$ %50 düzelme olması

Progrese Hastalık (PD): Aşağıdakilerden az 1 ölçüt sağlanmalıdır:

- Tedaviden önce var olan \geq 1,5 cm lenf nodu boyutunun \geq %50 artması veya \geq 1,5 cm yeni lenf nodu gelişmesi

- Karaciğer ve/veya dalak boyutunda \geq %50 artış olması veya tedavi öncesinde olmayan hepatomegali/splenomegali gelişmesi

- Periferik kanda lenfosit sayısı $\geq 5 \times 10^9/L$ olmak üzere lenfosit sayısının \geq %50 artması (BTK inhibitörü gibi tedavilerle lenfoid dokulardan kana lösemik hücrelerin çıkması nedeniyle lenfosit sayısında artış görülebilir. Bu ilaçlarla yapılan tedavilerde sadece lenfositözün varlığı progresyon şeklinde değerlendirilmemelidir.)

- Lenf nodu veya diğer dokulardan alınan biyopsi örneklerinin Richter transformasyonu lehine yorumlanması

•Tedaviden sonra en az 3 ay boyunca devam eden ve otoimmüniteye bağlı sitopeni olmayan hgb <10g/dL veya ≥ 2 g/dL düşüş olması, trombosit sayısı <100x10⁹/L veya ≥ 50 düşüş olması progresyon olarak değerlendirilir. Tedavi sürerken oluşan sitopeniler ilaçların toksik etkisi olabilir. Bu nedenle kemik iliği biyopsisi ile sitopeninin klonal KLL hücrelerinin infiltrasyonu nedeniyle olduğu ve ilaç toksisitesine bağlı olmadığı gösterilmelidir (74).

Stabil Hastalık (SD): CR, PR ve PD ölçütlerini karşılamayan hastalar bu grupta değerlendirilir.

- Lenf nodu boyutlarında %49 azalış ya da artış olması
- Karaciğer ve/veya dalak boyutunda %49 büyüme veya küçülme olması
- Periferik kan lenfosit sayısında %49 azalış ya da artış görülmesi
- Trombosit sayısında %49 azalış ya da artış olması
- Hemoglobin<11 g/dL veya tedavi öncesine göre <%50 veya < 2g/dL azalış olması
- Kemik iliği biyopsisinin aynı kalması

2.1.13. Komplikasyonlar

2.1.13.1. Enfeksiyonlar

KLL seyrinde görülen hipogamaglobulinemi, T hücre anormallikleri, kompleman aktivitesinde ve nötrofil/monosit fonksiyonundaki kusurlara bağlı hücrel ve humoral immünite bozuklukları enfeksiyonlara zemin hazırlar. Ayrıca tedavide kullanılan pürin analogları ve hedefe yönelik BTK ve PI3K inhibitörleri gibi ajanların immünsüpresif etkileri nedeniyle de enfeksiyon riski artar (42)

Tedavi almayan KLL hastaları *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi patojenlerin etken olduğu bakteriyel enfeksiyonlar için yüksek risk taşır (42). Fludarabin, alemtuzumab, idelalisib gibi ilaçlarla tedavi edilen veya allojenik HCT uygulanan hastalarda özellikle *Pneumocystis jirovecii* veya Herpesviridae (Herpes Simpleks Virüsü, VZV, CMV, Epstein-Barr Virüsü) gibi fırsatçı

enfeksiyonlar görülebilmektedir (74,124). Anti-CD20 antikorları B hücrelerini geçici olarak azaltır. Bu durum, ciddi enfeksiyon ve fırsatçı enfeksiyon riskini arttırmasa da, HBV reaktivasyonuna neden olabileceği için dikkatli olunmalıdır. İbrutinib kullanılan hastalarda ise hipogamaglobulinemi ve B hücre sinyal inhibisyonuna bağlı olarak hafif-orta şiddetli enfeksiyonlar görülebilmektedir (125). Venetoklaks, interferon-alfa üretiminde ve mutlak lenfosit sayısında azalmaya neden olur. Yapılan faz I-II çalışmalarında en sık üst solunum yolu enfeksiyonları ve pnömoni gibi hafif-orta şiddetli enfeksiyonlar olmak üzere hastaların %70'inde enfeksiyon gözlenmiştir. Ciddi fırsatçı enfeksiyonlara ise hastaların %3,6'sında rastlanmıştır (125).

ERIC (European Research Initiative on CLL) tarafından kanıtlanmış covid-19 pozitifliği olan 190 KLL hastasının incelendiği retrospektif bir çalışma yapılmıştır. Bu hastaların %80'inde oksijen desteği ve/veya yoğun bakım gerektirecek şekilde şiddetli bir klinik tablo görülmüştür. Hastanede yatan hastalarda %32,5 ölüm oranı gerçekleşmiştir. Hastalara verilen KLL tedavileri kıyaslandığında; BTK inhibitörü ajanların, hastaneye yatış ve covid-19 enfeksiyonu şiddeti açısından koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmiştir (126).

2.1.13.2. Richter Transformasyonu (RT)

KLL hastalarında, genellikle diffüz büyük B hücreli lenfoma (DLBCL) olmak üzere agresif bir lenfoma gelişmesini tanımlar. Hastaların %2-10'u civarında görülür (127). Hastalarda çoğunlukla karın bölgesinde olmak üzere LAP artışı, splenomegali ve şiddetlenen B semptomları ile karakterize ani bir klinik bozulma olur. LDH yüksekliği, β 2- mikroglobulin yüksekliği, monoklonal gamopati, anemi ve trombositopeni gibi laboratuvar bulguları görülebilir. LDH ve β 2-mikroglobulin yüksekliği, NOTCH1 mutasyon varlığı, mutasyona uğramamış IGHV, ZAP-70 pozitifliği, >3 cm LAP varlığı, del(13q) mutasyonunun bulunmaması, CD38 ekspresyonu RT gelişimi ile bağlantılı bulunmuştur (90,128).

Tanıyı kesinleştirmek için mutlaka biyopsi yapılmalıdır. PET görüntülemesinde en yüksek tutulumu sahip lenf nodlarından doku örneği alınmalıdır. Histopatolojik inceleme genellikle DLBCL ile uyumlu olurken, nadiren Hodgkin lenfoma (HL) olarak da yorumlanabilir (16). RT tespit edilirse, hastanın performans

durumu, komorbiditeleri ve histolojik alt tip birlikte değerlendirilerek tedaviye karar verilir (129).

2.1.13.3. Otoimmün Komplikasyonlar

OİHA, hastaların yaklaşık %4-10'unda görülür. İleri evre hastalık ve mutasyona uğramamış IGHV, 17p delesyonu, TP53 mutasyonu gibi genetik faktörler riski arttırmaktadır (130). Laboratuvar tetkiklerinde; izole hemoglobin düşüşü, pozitif direkt coombs testi, indirekt hiperbilirubinemi, retikülositoz, azalmış haptoglobin ve serum LDH yüksekliği dikkati çeker.

İTP, KLL hastalarının %2-5'inde görülür (131). İTP'de kemik iliği yetmezliği ya da hipersplenizm bulguları olmadan trombosit sayısında hızlı ve açıklanamayan bir düşüş görülür. Kemik iliği aspirasyon ve biyopsisinde normal veya artmış megakaryositler görülebilir. OİHA'nın da eşlik ettiği olgular Evans sendromu olarak isimlendirilmektedir.

Nadir görülen bir otoimmün komplikasyon olan PRCA, kemik iliğinde eritroid öncüllerin yokluğu ve periferik kanda retikülosit sayısında düşüş ile karakterizedir. Tedavide, eritrosit süspansiyonu ve kortikosteroid veya siklosporin gibi immünsupresif ajanlar kullanılır (71).

2.1.13.4. İkincil Maligniteler

KLL hastalarında sekonder hematolojik malignite ve solid tümör insidansında artış olabilmektedir. Tedavi verilen hastalarda miyelodisplastik sendrom (MDS) veya akut miyeloid lösemi (AML) gelişebilir. Fludarabinli tedavi protokollerinin MDS riskini arttırdığı bilinmektedir (132). SEER'e göre; 16.367 KLL hastasının ortalama 5,2 yıl izlenmesiyle yapılan çalışmada yaklaşık %11 ikinci solid tümör gelişimine rastlanmıştır. Bu oran genel popülasyona göre belirgin şekilde yüksektir. En sık görülen sekonder maligniteler; kaposi sarkomu, malign melanom, larinks kanseri ve akciğer kanseri şeklinde bildirilmiştir (133).

2.2. SERBEST RADİKALLER

Son yörüngelerinde eşleşmemiş elektronu olan ve karşılaştıkları molekülle elektron alışverişi yaparak onun yapısını değiştiren moleküllere serbest radikal veya

oksidan molekül adı verilir (134,135). Serbest radikaller, vücutta normal metabolizma esnasında veya çok farklı dış etkenlerle meydana gelebilir. Kısa ömürlü olmalarına rağmen çok tahrip edicidirler. En önemli serbest oksijen radikalleri; O_2^- (süperoksit) radikali, H_2O_2 (hidrojen peroksit), HO^- (hidroksil) radikali ve singlet oksijen ($O_2\uparrow\downarrow$)'dir (136).

Oksidanları oluşturan kaynaklar endojen ve eksojen olarak sınıflandırılır. Endojen kaynaklar; mitokondriyal elektron transport zinciri, fagositik hücreler, sitokrom P 450, sitokrom b5, ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, lipooksijenaz, prostoglandin sentetaz, hemoglobin, flavoproteinler, lipid peroksidasyonu, ve oto-oksidasyon reaksiyonlarıdır. Eksojen kaynaklar ise; sigara, pestisitler, çözücüler, petrokimya ürünleri, ilaçlar, alkol, güneş ışınları, X-ışınları ve strestir (137,138).

2.3. ANTIOKSIDAN SİSTEMLER

Vücuttaki serbest oksijen radikalleriyle ve bunların etkisiyle meydana gelen oksidatif stresle mücadele eden savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Serbest radikallerin oluşumunu engelleyen, metabolize edilerek vücuttan atılmasını sağlayan maddeler antioksidan maddeler olarak isimlendirilir. Antioksidan savunma sistemleri, enzimatik ve non-enzimatik olarak ikiye ayrılır. Enzimatik antioksidanlar; katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GSSG-R), glutatyon transferaz (GST) ve mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemidir. Non-enzimatik antioksidan maddeler ise; albümin, bilirubin, ürik asit, β -karoten (vitamin A), askorbik asit (vitamin C), α - tokoferol (vitamin E), seruloplazmin (CP), transferrin, ferritin, glutatyon, melatonin ve laktoferrin olarak sıralanabilir (139–141). TAS ölçümüyle, antioksidanları ayrı ayrı ölçmekten daha değerli veriler elde edilebilmektedir (142). Bu yüzden, plazmanın antioksidan durumunun tespitinde, tek tek antioksidanların ölçümünden ziyade, bu maddelerin toplam antioksidan değerini gösteren TAS ölçümü daha çok tercih edilmektedir (143).

2.4. OKSIDATİF STRES

Endojen ve eksojen kaynaklardan meydana gelen serbest oksijen radikalleri, vücut tarafından antioksidan mekanizmalarla dengelenmeye çalışılır. Bu dengenin bozulmasıyla oksidatif stres oluşur. Antioksidan; okside olabilen substratın

oksidasyonunu geciktiren veya engelleyen maddedir. Böylece antioksidanlar, serbest radikallerin hücre bileşenlerine verebileceği zararın önüne geçer (144). Oksidatif stres, çok fazla oksidan madde maruziyeti veya antioksidan sistemlerin yetersiz kalması şeklinde ifade edilebilir. Oksidatif hasarın irreversibl şekilde birikimi; hücre, doku ve organ düzeyinde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olabilir (145).

Tümör hücrelerinde antioksidan sistemlerde değişiklik ve reaktif oksijen radikalleri oluşumunda artış olduğu bilinmektedir (146). Genel olarak, neoplastik dokuların çoğunda yüksek lipid peroksidasyonu ve çeşitli DNA lezyonları tespit edilmiştir (147).

Oltra ve ark. KLL hastalarında SOD, CAT, GPx ve okside/redukte glutatyon oranı üzerinde çalışma yapmışlardır. SOD ve CAT aktivitesinin azaldığını, glutatyon aktivitesinin ise arttığını tespit etmişlerdir. Okside/redukte glutatyon oranını da azalmış olarak bulmuşlardır. Bu veriler ile, KLL'de belirgin bir oksidatif stres olduğunu ve hastalığın gelişiminde bu durumun da etkisinin olabileceğini belirtmişlerdir (148). Bakan ve arkadaşları da, KLL hastalarıyla kontrol grubu arasında GPx, GSSG-R, SOD, glutatyon, nitrik oksit (NO) ve malondialdehit (MDA) konsantrasyonlarını kıyaslamışlardır. Serum GPx, SOD ve glutatyon aktivitelerini KLL'de düşük, NO ve MDA seviyelerini ise yüksek bulmuşlardır. Sonuç olarak; KLL hastalarında artmış oksidatif strese bağlı olarak antioksidan enzimlerde yetersizlik olduğunu, bu yüzden de antioksidan desteği verilmesi gerektiğini vurgulamışlardır (149).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMAYA ALINAN HASTA VE KONTROL GRUBUNUN ÖZELLİKLERİ

Bu çalışma için, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi girişimsel olmayan etik kurulundan 25.05.2021 tarih ve 10 sayılı etik kurul onayı alındı. Takiben, Haziran 2021 - Aralık 2022 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi İç Hastalıkları Hematoloji polikliniğine başvuran, yeni tanı 38 KLL hasta ile yaş-cinsiyet uyumlu 38 kontrol grubu çalışmaya dahil edildi. Hastalara ve kontrol grubuna çalışma hakkında detaylı bilgilendirme yapıldı, gönüllü onam formu imzaları alındı. Çalışmanın bütün aşamaları, Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak yürütüldü.

Hasta grubu olarak, yeni tanı alan KLL hastaları seçildi. KLL tanısı için, IWCLL 2018 güncellemesi kullanıldı. Olgu grubuna; DM, HT, böbrek yetmezliği, serebrovasküler hastalık, gastrointestinal sistem hastalığı, koroner arter hastalığı, kronik karaciğer hastalığı, hematolojik ya da solid organ malignitesi gibi ek hastalığı olmayan katılımcılar alındı. Kontrol grubuna ise; yaş-cinsiyet uyumlu, bilinen bir hastalığı ve ilaç kullanım öyküsü olmayan katılımcılar alındı.

3.2. ÖLÇÜMLERİN YAPILMASI VE ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Tüm katılımcıların yaş ve cinsiyet bilgileri kaydedildi. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının her ikisinin de hematoloji poliklinik başvurusunda, rutin kan tetkikleri çalışıldı ve rutin tetkikler ile eş zamanlı ayrıca 15 ml venöz kan örneği alındı.

Rutin kan tetkiklerinde; biyokimyasal ve hormonal analizler için jelli vakumlu tüpler, hemogram ve sedimantasyon için etilendiamin tetraasetik asitli (EDTA) tüpler, koagülasyon için sitratlı tüpler kullanıldı. Tüm katılımcıların rutin kan tetkikleri içerisinde çalışılan tam kan sayım tetkiklerinden; WBC (beyaz kan hücresi), NEU (nötrofil), LEN (lenfosit), HGB (hemoglobün), HCT (hematokrit), MCV, MCH, MCHC ve PLT kaydedildi. Rutin kan tetkikleri içerisinde çalışılan biyokimyasal laboratuvar tetkiklerinden; üre, kreatinin, AST (Aspartat Aminotransferaz), ALT (Alanin Aminotransferaz), LDH (Laktat dehidrogenaz), ürik asit, total protein, albümin, sodyum, potasyum, kalsiyum ve fosfor kaydedildi. Rutin kan tetkikleri içerisinde çalışılan koagülasyon laboratuvar tetkiklerinden; PTZ (protrombin

zamanı), APTT (aktive parsiyel tromboplastin zamanı), fibrinojen ve D-dimer kaydedildi. Katılımcıların hemogram, biyokimya ve koagülasyon verileri, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda ölçülmüştür. Hemogram verileri Mindray BC-6800 hematoloji analizöründe, biyokimya verileri Roche Cobas C702 otoanalizöründe, koagülasyon verileri ACL TOP 700'de ölçülmüştür.

Hasta olgu ve sağlıklı kontrol gruplarının her ikisinden de rutin kan tetkikleri ve bu tetkikler ile eş zamanlı olarak fazladan 15 ml venöz kan örneği alındı. Alınan örnekler her seferinde 2 ml'lik 3 ayrı hemogram tüpüne ve 8 ml'lik jelli vakumlu tüpe aktarılarak TOS ve TAS ölçümleri, OSİ (Oksidatif Stres İndeksi), comet assay ile DNA hasarı incelemesi, serum 8-OHdG, gaz kromatografik analiz ölçümleri yapılmak üzere uygun test tüplerinde, uygun taşıma şartlarında, uygun sürede Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ve Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'na ulaştırıldı.

3.2.1. Kan Örneklerinden Lökosit İzolasyonu

Hasta ve kontrol grubundan alınan 2 ml'lik 3 ayrı hemogram tüpü aynı gün lökosit izolasyonu için Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda işleme tabi tutuldu ve numuneler analizin yapılacağı güne kadar -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.2. Kan Örneklerinden Serum İzolasyonu

Hasta ve kontrol grubundan alınan 8 ml'lik jelli vakumlu tüpler, aynı gün içerisinde serum izolasyonu için Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda işleme tabi tutuldu. Oda ısısındaki numune, 7260 rpm'de 6 dakika santrifüj edilerek hücresel fragmanlardan ayrıldı. Serum örnekleri alikotlandı ve ölçüm gününe kadar -80°C'deki derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.3. OKSİDATİF STRES VE COMET YÖNTEMİ İLE DNA HASARI PARAMETRELERİNİN ÖLÇÜMÜ

3.3.1. Total Oksidan Seviye (TOS) Ölçümü:

Ölçümün temel prensibi; numunenin içindeki oksidanların ferröz iyon şelatör kompleksinin ferrik iyonla dönüşümünün sağlanması ve bunun da asidik bir ortamda kromojen ile tepkimeye girerek absorbanst artışına neden olmasına dayanmaktadır. Spektrofotometrik olarak görülen absorbanst artışı, numunedeki oksidan moleküllerle doğru orantılıdır. TOS, deney sonunda elde edilen serum örneklerinde homojenatlarında ticari bir kit aracılığıyla (Rel Assay Diagnostic, Gaziantep, Türkiye) çalışıldı. Örnekte bulunan oksidanların (lipidler, proteinler vb.) miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti 492 nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/l başına ifade edildi.

3.3.2. Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü:

Ölçümün temel prensibi; numunenin içindeki tüm antioksidanların mavi-yeşil 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radikalini renksiz redükte ABTS haline getirmesi esasına dayanır. Örneğin absorbanstındaki değişim, onun antioksidan seviyesi ile doğru orantılıdır. TAS ölçümü ticari bir kit aracılığıyla (Rel Assay Diagnostic, Gaziantep, Türkiye) yapıldı. 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Sonuçlar mmol Trolox equivalent/l başına ifade edildi.

3.3.3. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ):

Oksidatif stres seviyesini gösteren başka bir parametre de, hesaplama ile elde edilen Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)'dir. Bu indeks, TAS ve TOS değerleri kullanılarak aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$\text{OSİ} = \text{TOS} (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eqv/L}) / \text{TAS} (\text{mmol Trolox Eqv/L}) \times 100$$

3.3.4. Comet assay ile DNA Hasarı İncelemesi:

Deney gruplarından alınan pıhtılaşması önlenen kandan 5 ml bir tüpe alınarak 1:1 oranında fosfat tamponu (PBS) ile seyreltildi. Bu 10 ml'lik seyreltilmiş kan içine 3 ml Ficol-1077 konmuş bir başka tüpe aktararak 400g'de 20 dakika santrifüj işlemi

uygulandı. Santrifüjle elde edilen pellet, 1 ml RPMI ile 2-3 kez yıkandıktan sonra, hemositometre ile sayıldı ve 100 mikrolitrede 2×10^4 hücre olarak ayarlandı. Bu şekilde hazırlanmış lenfosit süspansiyonundan 80 mikrolitre alınarak 100 μ l %0,5'lik Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen PBS ile 37°C'de hazırlanan "Low melting" agaroz (LMA) ile tekrar süspense edildi. Bu LMA + hücre karışımı önceden %1'lik "normal melting" agaroz (NMA) ile kaplanmış olan lam üzerine ince bir tabaka halinde döküldü ve 30 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 3. tabaka olarak 70 μ l %0,5'lik LMA ile kaplandı ve tekrar 10 dakika buz üzerinde bekletildi. Daha sonra lam hücresel proteinleri uzaklaştırmak amacıyla, pH'ı 10 olan soğuk lizis bağlama tamponu ile 60 dakika boyunca 40°C' de işleme tabi tutuldu. Lizis işlemi sonrası lamlar yatay jel elektroforezine aktarıldı ve yeni hazırlanmış alkalın elektroforez tamponunda 30 dakika boyunca inkübe edildi. Bu süre bitiminde lamlar yatay elektroforez tankına konularak 4°C'de, 300 mA akım altında 30 dakika boyunca elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez işleminin ardından, lamlar nötralizasyon tamponu (0,4M Tris-HCl, pH 7,5) ile alkalın ve deterjanları uzaklaştırmak amacıyla 3 kez 5 dakika 4°C' de yıkandı. Nötralizasyon işlemini takiben lamlar 60 μ l etidyum bromid (2 μ l/ml) ile boyanarak floresan mikroskopunda incelendi ve muhtemel DNA hasarı "Comet assay IV System (AutoComet)" program yazılımıyla değerlendirildi. Hasar değerlendirilmesinde yazılım aracılığı ile Head Length (Baş uzunluğu, μ m), Tail Length (Kuyruk uzunluğu, μ m), Head Intensity (Baş kısmındaki DNA yüzdesi, % H-DNA), Tail Intensity (Kuyruk kısmındaki DNA yüzdesi, % T-DNA) olarak ifade edildi.

3.3.5. Serum 8-OHdG Ölçümü:

Reaktif oksijen radikalleri, DNA'da 20'nin üzerinde oksidatif baz hasar ürünü meydana getirmektedir. Hasara uğrayan bazlar arasında 8-OHdG, en duyarlı ve en sık rastlanan oksidatif DNA hasarı belirteçidir. Düzeyi, lökositlerde veya idrarda ölçülebilmektedir. Alınan kan numunelerinden serum 8-OHdG seviyesi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Laboratuvarı'nda ELISA yöntemiyle Elabscience 8-OHdG (8-Hydroxydeoxyguanosine) ELISA Kit (E-EL-0028) kullanılarak ölçüldü.

3.3.6. Gaz Kromatografik Analiz:

Bu analiz, Pamukkale Üniversitesi İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarları'nda yapıldı. Gaz Kromatografik (GC) analiz için cihaz, alev iyonizasyon dedektörü ve aRtx-2330 kolon (%90 biscyanopropyl-%10 phenylcyanopropyl polysiloxane kapiller kolon; 60 m, 0.25 mm i.d., 0.20-mm film kalınlığı) ekipmanlarına sahiptir. Isı uygulamasına 160°C 55 dakika ile başlanıp, dakikada 5°C artışla 195°C 'de 10 dakika tutuldu ve dakikada 10°C artışla 250°C'ye getirildi. Sabit basınç 29 psi olarak uygulanıp, ısı 150°C'den başlatılarak 1 dakika sonra dakikada 8°C artışla 250°C'ye kadar getirildi. Sabit basınç modu 13 psi olarak seçilip, bütün yağ asitleri ve izomerleri GC analizi ile tespit edildi. Referanslar ile kıyaslanarak doğrulama yapıldı. Hücre membranlarına ait yağ asidi içeriği yüzde oranı şeklinde verildi.

3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, medyan en düşük, en yüksek, frekans ve oran değerleri kullanılmıştır. Değişkenlerin dağılımı Kolmogorov Simirnov test ile ölçüldü. Nicel bağımsız verilerin analizinde bağımsız örneklem t test ve Mann-Whitney U test kullanıldı. Nitel bağımsız verilerin analizinde ki-kare test kullanıldı. Analizlerde SPSS 28.0 programı kullanılmıştır. Tüm analizlerde $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya; Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji polikliniğine başvuran, dahil edilme ölçütlerimize uygun toplam 76 kişi (38 kişi olgu grup, 38 kişi kontrol grup) alındı. Gruplar, olgu ve kontrol grubu olmak üzere ayrıldı. Çalışmaya katılan tüm kişilerin (olgu ve kontrol grup) toplam yaş ve cinsiyet verileri Tablo 9’da; tam kan sayımı, biyokimyasal ve koagülasyon parametreleri Tablo 10’da; TOS, TAS ve OSİ değerleri, comet yöntemi ile DNA hasar değerleri (Head Lenght, Tail Lenght, Head Intensity, Tail Intensity, Tail Moment, Tail Migration) ve 8-OHdG Tablo 11’de gösterilmiştir.

Tablo 9. Çalışmaya Katılan Tüm Kişilerin Yaş ve Cinsiyet Verileri

		Min-Mak			Medyan	Ort.±ss/n-%		
Yaş		43.0	-	86.0	66.0	66.4	±	11.0
Cinsiyet	Kadın					33		43.4%
	Erkek					43		56.6%

Min: Minimum Mak: Maksimum Ort: Ortalama ss: Standart Sapma

Tablo 10. Çalışmaya Katılan Tüm Kişilerin Tam Kan Sayımı, Biyokimyasal ve Koagülasyon Parametre Verileri

	Min-Mak			Medyan	Ort.±ss/n-%		
WBC (K/uL)	4.8	-	185.0	11.0	20.9	±	29.0
NEU (K/uL)	1.2	-	8.6	4.4	4.6	±	1.6
LEN (K/uL)	1.5	-	142.7	3.6	12.4	±	21.0
HGB (g/dL)	6.9	-	17.8	13.6	13.5	±	2.1
HCT (%)	21.8	-	51.7	41.0	40.9	±	5.7
MCV (fL)	68.3	-	110.3	88.0	88.4	±	7.2
MCH (pg)	19.8	-	36.4	29.6	29.2	±	2.7
MCHC (g/dL)	28.8	-	35.2	33.4	33.0	±	1.3
PLT (K/uL)	44.0	-	586.0	232.0	223.9	±	88.0
Üre (mg/dL)	14.0	-	67.0	29.0	31.4	±	10.2
Kreatinin (mg/dL)	0.42	-	1.41	0.80	0.85	±	0.20
AST (IU/L)	10.0	-	42.0	16.0	17.3	±	5.3
ALT (IU/L)	6.0	-	48.0	15.5	16.9	±	8.3
LDH (U/L)	122.0	-	377.0	182.5	189.1	±	46.3
Beta 2 mikroglobulin (mg/L)	1.7	-	13.5	3.2	4.1	±	2.5

Ürik Asit (mg/dL)	2.1	-	9.0	5.0	5.0	±	1.3
T.Protein (g/L)	51.0	-	93.4	68.7	69.3	±	5.9
Albümin (g/L)	31.0	-	51.9	44.9	44.5	±	4.0
Sodyum (mmol/L)	127.0	-	149.0	141.0	140.7	±	3.1
Potasyum (mmol/L)	3.81	-	5.49	4.57	4.58	±	0.40
Kalsiyum (mg/dL)	8.4	-	10.2	9.3	9.3	±	0.4
Fosfor (mg/dL)	2.0	-	4.8	3.4	3.4	±	0.6
PTZ (saniye)	10.2	-	15.4	11.5	11.8	±	0.9
APTT (saniye)	21.2	-	35.8	26.6	27.1	±	3.3
Fibrinojen (mg/dL)	171.0	-	535.0	268.5	288.9	±	86.2
D-Dimer (ng/mL)	58.0	-	4699.0	270.0	475.0	±	727.7

Min: Minimum Mak: Maksimum Ort: Ortalama ss: Standart Sapma WBC: Beyaz kan hücresi NEU: Nötrofil HGB: Hemoglobin HCT: Hematokrit MCV: Ortalama hücre hacmi MCH: Ortalama hücre hemoglobini MCHC: Ortalama hücre hemoglobin konsantrasyonu PLT: Trombosit AST: Aspartat aminotransferaz ALT: Alanin aminotransferaz LDH: Laktat dehidrogenaz PTZ: protrombin zamanı APTT: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı

Tablo 11. Çalışmaya Katılan Tüm Kişilerin Comet Yöntemi ile DNA Hasar, 8-OHdG ve Oksidatif Stres Parametre Verileri

	Min-Mak			Medyan	Ort.±ss/n-%		
TOS (µmol H ₂ O ₂ equivalent/l)	3.05	-	14.83	6.62	7.38	±	3.02
TAS (mmol Trolox equivalent/l)	0.2	-	1.8	1.1	1.1	±	0.3
OSI (arbitrary unit, A.U)	260.0	-	5720.5	656.6	809.4	±	680.6
Head Length (µm)	24.5	-	34.4	28.8	29.1	±	2.1
Head Intensity (%)	46.2	-	94.8	83.3	79.9	±	10.8
Tail Length (µm)	16.1	-	46.1	25.2	26.3	±	6.2
Tail Intensity (%)	5.2	-	53.8	16.7	20.1	±	10.8
Tail Moment	0.5	-	10.7	2.4	3.2	±	2.2
Tail Migration	3.6	-	32.7	10.5	11.8	±	6.1
8-OHdG (ng/ml)	2.3	-	80.2	6.6	10.7	±	12.5

Min: Minimum Mak: Maksimum Ort: Ortalama ss: Standart Sapma TOS: Total Oksidan Seviye TAS: Total Antioksidan Seviye OSI: Oksidatif Stres İndeksi 8-OHdG: 8-hidroksi-2'-deoksiganizin

Olgu ve kontrol grubu arasında hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı anlamlı farklılık göstermemiştir (p>0.05). Tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 12. Yaş ve Cinsiyet Verilerinin Gruplar Arası Analizi

		Kontrol Grubu				Olgu Grubu				p değeri	
		Ort.±ss/n-%		Medyan	Ort.±ss/n-%		Medyan				
Yaş		66.9	±	10.9	66.5	65.9	±	11.3	66.0	0.680	^t
Cinsiyet	Kadın	18		47.4%		15		39.5%		0.488	^{x²}
	Erkek	20		52.6%		23		60.5%			

^tBağımsız örneklem t test / ^{x²}Ki-kare test Ort: Ortalama ss: Standart Sapma

Olgu grubunda WBC, LEN ve PLT değeri kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla p=0.000 , p=0.000 ve p=0.000). Olgu grubunda HGB ve HCT değeri kontrol grubundan anlamlı olarak daha düşüktü (sırasıyla p=0.026 ve p=0.022). Olgu ve kontrol grubu arasında NEU, MCV, MCH ve MCHC değeri anlamlı farklılık göstermemiştir (p>0.05). Tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 13. Tam Kan Sayımı Parametrelerinin Gruplar Arası Analizi

	Kontrol Grubu				Olgu Grubu				p değeri	
	Ort.±ss		Medyan	Ort.±ss		Medyan				
WBC (K/uL)	7.5	±	1.8	7.3	34.4	±	36.5	23.9	0.000	^m
NEU (K/uL)	4.5	±	1.4	4.2	4.8	±	1.8	4.8	0.394	^t
LEN (K/uL)	2.4	±	0.6	2.3	23.3	±	26.4	13.1	0.000	^m
HGB(g/dL)	14.1	±	1.8	14.5	13.0	±	2.3	13.4	0.026	^t
HCT(%)	42.4	±	5.1	43.2	39.4	±	6.0	40.3	0.022	^t
MCV(fL)	87.9	±	6.7	87.7	88.8	±	7.7	89.4	0.623	^t
MCH(pg)	29.2	±	2.5	29.2	29.2	±	2.9	29.7	0.910	^t
MCHC(g/dL)	33.2	±	1.1	33.5	32.8	±	1.4	33.3	0.203	^m
PLT (K/uL)	262.4	±	70.6	258.5	185.4	±	87.4	181.0	0.000	^m

^tBağımsız örneklem t test / ^mMann-whitney u test Ort: Ortalama ss: Standart Sapma WBC: Beyaz kan hücresi NEU: Nötrofil HGB: Hemoglobin HCT: Hematokrit MCV: Ortalama hücre hacmi MCH: Ortalama hücre hemoglobin MCHC: Ortalama hücre hemoglobin konsantrasyonu PLT: Trombosit

Olgu grubunda üre, kreatinin, LDH, ürik asit ve potasyum değeri kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla p=0.000 , p=0.002 , p=0.007 , p=0.019 ve p=0.037). Olgu ve kontrol grubu arasında AST, ALT , total protein,

albümin, sodyum, kalsiyum ve fosfor değeri anlamlı farklılık göstermemiştir (p>0.05). Tablo 14'te gösterilmiştir.

Tablo 14. Biyokimyasal Parametrelerin Gruplar Arası Analizi

	Kontrol Grubu			Olgu Grubu				p değeri	
	Ort.±ss		Medyan	Ort.±ss		Medyan			
Üre	26.5	± 6.8	25.0	36.2	± 10.7	35.5	0.000	t	
Kreatinin	0.78	± 0.16	0.77	0.92	± 0.22	0.91	0.002	t	
AST	16.6	± 4.0	15.0	18.1	± 6.4	17.0	0.538	m	
ALT	18.6	± 9.1	16.5	15.1	± 7.1	15.0	0.074	m	
LDH	175.6	± 33.3	169.0	202.7	± 53.4	189.5	0.007	m	
Ürik Asit	4.6	± 1.2	4.5	5.4	± 1.2	5.2	0.019	m	
T.Protein	69.7	± 4.9	69.1	69.0	± 6.8	68.4	0.602	t	
Albümin	44.6	± 3.1	44.9	44.3	± 4.7	45.0	0.934	m	
Sodyum	140.3	± 2.2	140.0	141.1	± 3.7	141.0	0.063	m	
Potasyum	4.48	± 0.43	4.44	4.67	± 0.35	4.61	0.037	t	
Kalsiyum	9.29	± 0.42	9.34	9.37	± 0.37	9.35	0.421	t	
Fosfor	3.40	± 0.53	3.45	3.44	± 0.62	3.42	0.797	t	

^tBağımsız örneklem t test / ^mMann-whitney u test Ort: Ortalama ss: Standart Sapma

Olgu grubunda APTT değeri kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksekti (p=0,000). Olgu ve kontrol grubu arasında PTZ, fibrinojen ve d-dimer değeri anlamlı farklılık göstermemiştir (p>0.05). Tablo 15'te gösterilmiştir.

Tablo 15. Koagülasyon Parametrelerinin Gruplar Arası Analizi

	Kontrol Grubu			Olgu Grubu				p değeri	
	Ort.±ss		Medyan	Ort.±ss		Medyan			
PTZ (saniye)	11.8	± 0.7	11.7	11.8	± 1.1	11.5	0.348	m	
APTT (saniye)	25.6	± 2.5	25.2	28.9	± 3.3	29.4	0.000	m	
Fibrinojen (mg/dL)	274.9	± 80.3	252	307.9	± 91.7	301	0.126	t	
D-Dimer (ng/mL)	313.7	± 134.6	270	679.4	± 1059.7	283.5	0.897	m	

^tBağımsız örneklem t test / ^mMann-whitney u test Ort: Ortalama ss: Standart Sapma PTZ: protrombin zamanı APTT: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı

Olgu grubunda TOS ve OSİ değeri kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla p=0.014 ve p=0.022). Olgu ve kontrol grubu arasında TAS değeri anlamlı farklılık göstermemiştir (p>0.05). Tablo 16’da gösterilmiştir.

Tablo 16. Oksidatif Stres Parametrelerinin Gruplar Arası Analizi

	Kontrol Grubu				Olgu Grubu				p değeri	
	Ort.±ss			Medyan	Ort.±ss			Medyan		
TOS (µmol H2O2 equivalent/l)	6.3	±	1.7	6.3	8.5	±	3.6	8.5	0.014	^m
TAS (mmol Trolox equivalent/l)	1.07	±	0.30	1.05	1.05	±	0.33	1.06	0.798	^t
OSI (arbitrary unit, A.U)	648.3	±	311.2	583.9	970.6	±	888.1	802.0	0.022	^m

^t Bağımsız örneklem t test / ^m Mann-whitney u test Ort: Ortalama ss: Standart Sapma TOS: Total Oksidan Seviye TAS: Total Antioksidan Seviye OSİ: Oksidatif Stres İndeksi

Olgu grubunda tail length, tail intensity, tail moment ve tail migration değeri kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla p=0.002 , p=0.003 , p=0.005 ve p=0.000). Olgu grubunda head intensity değeri kontrol grubundan anlamlı olarak daha düşüktü (p=0.003). Olgu ve kontrol grubu arasında head length değeri anlamlı farklılık göstermemiştir (p>0.05). Tablo 17’de gösterilmiştir.

Tablo 17. Comet Yöntemi ile DNA Hasar Parametrelerinin Gruplar Arası Analizi

	Kontrol Grubu				Olgu Grubu				p değeri	
	Ort.±ss			Medyan	Ort.±ss			Medyan		
Head Length (µm)	29.3	±	2.3	29.0	29.0	±	2.0	28.8	0.670	^m
Head Intensity (%)	83.5	±	9.1	85.9	76.4	±	11.3	76.2	0.003	^m
Tail Length (µm)	24.4	±	6.0	22.9	28.3	±	5.8	27.9	0.002	^m
Tail Intensity (%)	16.5	±	9.1	14.1	23.6	±	11.3	23.8	0.003	^m
Tail Moment	2.6	±	2.0	1.9	3.9	±	2.3	3.5	0.005	^m
Tail Migration	9.7	±	5.9	7.4	13.9	±	5.5	13.6	0.000	^m

^m Mann-whitney u test Ort: Ortalama ss: Standart Sapma

Olgu ve kontrol grubu arasında 8-OHdG değeri anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0.05$). Tablo 18’de gösterilmiştir.

Tablo 18. 8-OHdG Düzeyinin Gruplar Arası Analizi

	Kontrol Grubu			Vaka Grubu			p değeri	
	Ort.±ss		Medyan	Ort.±ss		Medyan		
8-OHdG (ng/ml)	10.0	± 8.4	7.7	11.3	± 15.5	6.3	0.809	^m

^m Mann-whitney u test Ort: Ortalama ss: Standart Sapma

Eritrosit membranındaki monounsatüre yağ asitleri olan; Hekzadekanoat, Nonadekanoat, Oktadekanoat, Tetradekanoat değerleri, olgu ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0.05$). Tablo 19’da gösterilmiştir.

Tablo 19. Eritrosit Membran Yağ Asitlerinin Gruplar Arası Analizi

Monounsatüre Yağ Asitleri	Kontrol Grubu		Vaka Grubu		p değeri	
Hekzadekanoat	6	30,0%	6	27,3%	0.733	^{X²}
Nonadekanoat	2	10,0%	5	22,7%		
Oktadekanoat	6	30,0%	6	27,3%		
Tetradekanoat	6	30,0%	5	22,7%		

^{X²} Ki-kare test

	Kontrol Grubu			Vaka Grubu			p değeri	
	Ort.±ss/n-%		Medyan	Ort.±ss/n-%		Medyan		
Alan Yüzdesi (%) - FAME	30,0	± 27,9	30,0	27,3	± 30,0	15,9	0.641	^m

^m Mann-whitney u test Ort: Ortalama ss: Standart Sapma

5. TARTIŞMA

KLL, batı ülkelerinde en sık görülen erişkin lösemisidir (3,15). Yaşla birlikte, insidans da artmaktadır (2,15). Erkeklerde kadınlara göre yaklaşık 2 kat fazla görülür (18). Yapılan etyolojik çalışmalarda; çevresel, kimyasal ve radyasyon maruziyeti, diyet, virüs enfeksiyonu ve otoimmün hastalıklarla KLL gelişimi arasındaki ilişki kanıtlanmamıştır (24-26). Olgu ve kontrol gruplarının birinci derece akrabalarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, olgu grubunun akrabalarında 8,5 kat daha fazla risk olduğunun gösterilmesi, genetik bir eğilim olduğunu düşündürmektedir (28). KLL'nin antioksidan enzimlerdeki değişiklikler ve oksidatif strese karşı duyarlı bir hastalık olduğu, bu hastalarda baskın bir oksidatif stres varlığı, daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmamızda, KLL hastalarında sistemik oksidatif stres parametreleri yanında, comet yöntemi ile izole edilen lenfositlerde DNA hasarı varlığı ve eritrosit membranı lipit profili de araştırılmıştır. Elde edilen verilerle, KLL patogenezi ve gelecekteki tedavilere yönelik bilimsel katkı sağlamayı amaçladık.

Çalışmamıza dahil edilen 38 KLL hastasının 23'ü erkek (%60,5), 15'i ise kadındı (%39,5) ve erkek/kadın oranı 1.53 idi. 2021 yılındaki SEER verilerinde de KLL hastalarındaki erkek/kadın oranı 1.9/1 idi ve çalışmamızda elde edilen verilere benzerdi. 2022 yılında Jeral ve ark. tarafından KLL hastaları üzerinde yapılan retrospektif tek merkez çalışmasında da, erkek/kadın oranı bizim çalışmamıza benzer şekilde 1.47 olarak bulunmuştur (150).

Çalışmamızda hastaların tanı anındaki medyan yaşları 66 (43-86) olarak hesaplandı. Jeral ve ark. tarafından yapılan ve yukarıda bahsedilen çalışmada da, tanı anındaki ortalama yaş, bizim çalışmamızla benzer şekilde 63 olarak bulunmuştur. Yine 2022'de Özüncü ve ark. tarafından, KLL hastaları ile yapılan diğer bir çalışmada da ortalama tanı yaşı 60 olarak hesaplanmıştır (150,151).

Hastaların laboratuvar parametreleri incelendiğinde; medyan lökosit, lenfosit, nötrofil, hemoglobin, hematokrit ve trombosit değerleri sırasıyla 23.900 K/uL, 13.100 K/uL, 4.800 K/uL, 13,4 g/dL, % 40,3 ve 181.000 K/uL idi. β 2-mikroglobulin düzeyi, ölçülen hastalardan 22'sinde, laboratuvar aralığına göre yüksekti ve medyan değer 3,2 mg/L idi. LDH değeri toplam 11 hastada laboratuvar referans aralığına göre yüksek olarak saptandı ve medyan değer 182,5 U/L idi. Rai evresi arttıkça LDH, β 2-

mikroglobulin ve lenfosit sayılarının arttığı gözlemlense de, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Çalışmamızın tek merkez deneyimi olması ve bu nedenle hasta sayısının kısıtlı olması, farkın istatistiksel anlamlılığa ulaşmamasının nedeni olarak açıklanabilir.

2021 yılında Evran ve ark. tarafından, KLL hastalarında hipogamaglobulinemi sıklığı ve hipogamaglobulineminin tedavi yanıtları ve komplikasyonlar ile sağkalım üzerine etkilerinin değerlendirildiği bir çalışma yapılmıştır. Çalışmaya 137'si kadın (%41,1), 196'sı erkek (%58,9) olmak üzere toplam 333 hasta dahil edilmiş. Çalışma sonucu medyan lökosit, lenfosit, hemoglobin, trombosit ve LDH değerleri sırasıyla 24.570/mm³ (1.890-352.130), 17.450/mm³ (1.300-332.280), 13 gr/dl (4,3-18), 197800 (5.000-584.000) /mm³, 216,5 (113-1621) olarak tespit edilmiş (152). Çalışmamızdaki lökosit, lenfosit, trombosit ve LDH değerlerinin bu çalışmaya göre daha düşük; hemoglobin değerinin ise yüksek olduğu görüldü. Bu farkın; bizim çalışmamızdaki hasta sayısının kısıtlılığına bağlı olduğu düşünüldü.

Çalışmamızdaki olgu grubunun TOS ve OSİ değerleri kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla p=0.014 ve p=0.022). Olgu ve kontrol grubu arasında TAS değeri anlamlı farklılık göstermemiştir (p>0.05).

2014 yılında, Top ve ark. tarafından yapılan, KLL hastalarında nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (NGAL) ve oksidatif stres düzeylerinin incelendiği çalışmaya, 30 hasta ve 21 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Olgu grubunda serum TAS seviyesi kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur (1.27 ± 0.16'e karşı 1.45 ± 0.17; p=0.001). Tersine serum TOS seviyesi olgu grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek saptanmıştır (11.7 ± 4,2'e karşı 6,64 ± 2,73; p<0.001). Benzer olarak OSİ seviyesi de hasta grupta daha yüksek bulunmuştur (9.28 ± 3.19'a karşı 4.59 ± 1,93; p<0.001) (153). Bizim çalışmamızdakine benzer şekilde, bu çalışmada da olgu grubunun TOS ve OSİ seviyeleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada TAS seviyesi kontrol grubuna göre düşük bulunmuş, ancak bizim çalışmamızda hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu durumun sebebinin, her iki çalışmanın da kısıtlı hasta sayısı ile yapılması ve gruplar arası dağılım farklılığı olduğu düşünüldü.

Zhevak ve ark. Haziran 2016 ve Haziran 2018 yılları arasında, 64 KLL tanılı hasta ve 30 sağlıklı kişi üzerinde, oksidatif stres ve sitogenetik anormallikler arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Olgu ve kontrol grubu arasında, oksidatif stres biyobelirteçleri olarak konjuge dienler (CD), malondialdehit (MDA) ve nitrit; antioksidan biyobelirteçler olarak CP seviyesi ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; CD, MDA, nitrit ve CP'nin serum seviyeleri hasta grupta artmış ve GPx aktivitesi azalmış olarak bulunmuştur (tüm karşılaştırmalar için $p < 0.001$). Araştırmacılar, KLL hastalarında oksidatif stresin arttığı ve antioksidan savunma sisteminde yetersizlik olduğu sonucuna ulaşmışlardır (154). Vücuttaki oksidatif düzey ölçümü farklı olsa da, bu farklılığın ölçüm kitinin ve ölçülen oksidatif parametrenin farklılığından ve ölçüm yönteminden kaynaklanabileceğini düşünüyoruz. Çünkü, oksidatif durumu ölçmek için kolorimetrik, floresan veya kemilüminesans içeren metodlar kullanılabilir (155). Çalışmamızda KLL'nin meydana getirdiği oksidatif durum değerlendirilmiş olup; TAS, TOS, OSİ, serum 8-OHdG düzeyi ve comet yöntemi ile DNA hasarının düzeyi arasındaki parametre farklılıkları da ortaya konulmuştur. Oksidan durumu yansıtan bu belirteçlerin kendi aralarında da çelişkili olduğu durumlar mevcuttur. Oksidatif stres ölçümündeki hangi yöntemin KLL'ye daha spesifik olduğunun bilinmemesi, yöntemlerin üstünlük çalışmasının olmaması, çalışmamızın kısıtlayıcı nedenleri arasında sayılabilir. Bu açıdan oksidan düzeyinin göstergelerinin belirlenmesinde, uluslararası standartlarla oluşturulacak ölçüm parametrelerinin oluşturulmasına ve ileri araştırmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Collado ve ark. tarafından KLL'de olumsuz sitogenetik alt gruplarla ilişkili artmış oksidatif hasarın incelendiği bir çalışma yapılmıştır. Çalışmaya KLL tanısı konulan, tedavi edilmemiş 55 hasta dahil edilmiştir. Hastaların 18'inde del(13q14), 8'inde trizomi 12, 6'sında del(11q22), 6'sında del(17p13) mevcutken, 17 hasta normal FISH yapısıyla çalışmaya alınmıştır. KLL hastalarının B hücrelerinde ve idrarında 8-okso-dG, glutatyon ve malondialdehit (MDA) seviyeleri gibi oksidatif stres parametreleri ölçülmüş. Bu değerler 5 farklı sitogenetik alt grup arasında karşılaştırılmıştır. Sonuçlar; olumsuz sitogenetik riskli KLL hastalarından alınan B hücrelerinin, ROS'un neden olduğu hasara duyarlı olduğunu ve bunun da 8-okso-dG ve/veya lipid peroksidasyon gibi oksitlenmiş DNA bazlarının düzeylerinde artışa yol

açtığını göstermiştir. Bu çalışmayı yapan araştırmacılar ayrıca, KLL hastalarında sağkalımı iyileştirmek için antioksidanların mevcut terapötik stratejilerle kombinasyon halinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir (156).

Collado ve ark. yaptıkları başka bir çalışmada da, MBL'de erken ROS aracılı DNA hasarı ve oksidatif stres biyobelirteçlerini incelemişlerdir. Çalışmaya 29 MBL tanılı hasta, 55 KLL tanılı hasta ve 31 sağlıklı kontrol alınmıştır. Tedavi edilmemiş KLL ve MBL hastalarından alınan lenfositler ve idrar örneklerinde GSSG/GSH oranını, CAT aktivitesini ve oksidasyon ürünleri olan MDA, 8-izoprostan ve 8-okso-dG seviyelerini, sağlıklı gruba karşılaştırmışlardır. Hem indirgenmiş hem de oksitlenmiş glutatyon formları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MBL ve KLL hastalarında önemli ölçüde artmış bulunmuştur. Bu nedenle, hücre redoks durumunun göstergesi olarak kabul edilen GSSG/GSH oranlarının yüzde değerleri, MBL'de (%10,4, $p < 0.001$) ve KLL'de (%9,2, $p < 0.001$) yaklaşık 2 kat daha yüksek, kontrol grubunda (%5.8) gözlemlenenden daha fazla bulunmuştur. Hasta gruplarındaki hücrelerin CAT aktiviteleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuş ve hasta grupları arasında fark gözlenmemiştir. MDA seviyeleri, hastalarla kontrol grubu (0,4 nmol/mg) karşılaştırıldığında önemli ölçüde MBL'de (1,2 nmol/mg, $p < 0.001$) ve KLL'de (1,1 nmol/mg, $p < 0.001$) daha yüksek bulunmuştur. Ancak, 8-izoprostan konsantrasyonlarında önemli bir fark gözlenmemiştir. MBL (39,5 8-okso-dG/10⁶ dG, $p < 0.001$) ve KLL (48,4 8-okso-dG/10⁶ dG, $p < 0.001$) hastalarının lenfositlerindeki hasarlı bazların sıklığı, sağlıklı kişilere göre (6.1 8-okso-dG/10⁶ dG) yaklaşık sekiz kat daha yüksek tespit edilmiş, idrarda da benzer şekilde hasta gruplarında artmış 8-okso-dG konsantrasyonları saptanmıştır. Hasta grupları arasında ise anlamlı fark görülmemiştir (157).

Bu çalışmalar incelendiğinde; Zhevak ve ark. oksidatif stres biyobelirteci olarak CD, MDA ve nitrit; antioksidan biyobelirteçler olarak CP seviyesi ve GPx aktivitesini kullanmışlardır. Collado ve ark. ise 8-okso-dG, glutatyon ve MDA'yı oksidatif stres parametresi olarak kullanmışlardır. Bizim çalışmamızda TAS, TOS ve OSİ parametreleri üzerinden değerlendirme yapılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız kitler ile total oksidatif status ve total antioksidan status ölçülmüş ve tekli parametrelerden ziyade, total durum hakkında bilgi sağlanmıştır. Bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde; oksidatif stresin farklı parametrelerle değerlendirilmesi,

oksidatif stres ölçüm kitlerinin farklı olması, seçilen yaş ve cinsiyet dağılım farklılığı, hastalık evrelerinin değişkenliği ve gruplar arası heterojenite gibi karşılaştırmayı kısıtlayan durumlar mevcuttur. Ancak yine de ortak sonuç olarak; KLL hastalarında oksidatif stres parametrelerinin arttığı, antioksidan parametrelerin ise azaldığı görülmektedir.

Oltra ve ark. KLL hastalarında SOD, CAT, GPx ve okside/redukte glutasyon oranı üzerinde çalışma yapmışlardır. SOD ve CAT aktivitesinin azaldığını, glutasyon aktivitesinin ise arttığını tespit etmişlerdir. Okside/redukte glutasyon oranını da azalmış olarak bulmuşlardır. Bu veriler ışığında, KLL'de belirgin bir oksidatif stres olduğunu ve hastalığın gelişiminde bu durumun da etkisinin olabileceğini belirtmişlerdir (148).

De Rosa ve ark. rituksimab ve bendamustin (RB) ile tedavi edilen KLL hastalarında translokator protein (TSPO) ve oksidatif stres belirteçlerinin prognostik rolünü araştırdıkları bir çalışma yapmışlardır. Çalışmaya 30 hasta ve 10 sağlıklı dahil edilmiştir. Hasta ve sağlıklı gruplar arasında, KLL hastalarının lenfositlerinde oksidatif stresin iki belirteci olan tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) ve nitrik oksit (NO) seviyeleri karşılaştırılmıştır. RB tedavisi başladıktan 6 ay sonra, yanıt veren hastalar kaspaz-3 aktivitesinde bir güçlenmenin yanı sıra NO ve TBARS seviyelerinde güçlü bir artış sergilemiştir. Özellikle, tedaviye dirençli olan 6 hastada, daha düşük kaspaz-3 aktivitesi ve TBARS seviyeleri görülmüştür. Bu verilerle, NO ve TBARS seviyelerindeki artışın yanı sıra kaspaz-3 aktivite seviyelerindeki artışın tedaviye yanıtı öngörebileceğini belirtmişlerdir. Özellikle, yanıt veren hastalarda, kaspaz-3 aktivitesinde ve NO seviyesindeki artışların, muhtemel bir anti-tümör ve pro-apoptotik rolü olabileceğini düşünmüşlerdir (158).

Zelen ve ark. KLL hastalarında antioksidan enzim aktiviteleri ve oksidatif stres belirteçlerinin plazma seviyelerini inceledikleri bir çalışma yapmışlardır. Çalışmaya Binet sistemine göre sınıflandırılmış, evre A'da 29 ve evre B ve C'de 21 KLL hastası ve 31 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Plazma CAT aktivitesi kontrol grubuyla kıyaslandığında KLL hastalarında artmış bulunmuştur. Ayrıca, hastalığın ilerlemesi, CAT'ın önemli ölçüde daha yüksek plazma aktivitesi ile ilişkili olarak değerlendirilmiştir. Aynı şekilde, KLL hastaları, kontrollerle karşılaştırıldığında

önemli ölçüde daha yüksek plazma MDA konsantrasyonu göstermiştir. Test edilen gruplar arasında süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit ile SOD ve GPx'in plazma aktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık kaydedilmemiştir (159). Bu çalışmada; hasta grubun CAT aktivitesi ve MDA konsantrasyonunun yüksek çıkması, bizim çalışmamızın sonuçlarını ve literatürdeki benzer çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir. Gruplar arasında süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit ile SOD ve GPx'in plazma aktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşmamasının temel nedeni ise, örneklem sayısının yetersizliği ile açıklanabilir.

D'Arena ve ark. KLL'de oksidatif stres ve antioksidan savunma durumu ölçümünün prognostik önemini değerlendirdikleri bir çalışma yapmışlardır. Türetilmiş reaktif oksijen metabolitleri (d-ROM) testi ve biyolojik antioksidan potansiyeli (BAP) testi, KLL'li 165 hastanın tanısında değerlendirilmiş ve klinik-biyolojik özellikler ve prognoz ile korele edilmiştir. KLL hastalarında normal kontrollere göre artmış oksidatif hasar (d-ROM testi) ve azalmış antioksidan potansiyeli (BAP testi) bulunmuştur ($p < 0.0001$). Kadınlarda ($p = 0.0003$), mutasyona uğramamış IGHV'li hastalarda ($p = 0.04$), olumsuz sitogenetikte ($p = 0.002$) ve daha ileri klinik evrede ($p = 0.002$) daha yüksek d-ROM değerleri elde edilmiştir. CD49d ifade eden ($p = 0.01$) ve klinik evresi daha ileri olan hastalarda ($p = 0.004$) daha yüksek BAP testi değerleri görülmüştür. 48 aylık medyan takipte, d-ROM değerleri ≥ 418 CARR U olan KLL hastalarının ilk tedaviye kadar geçen sürenin (TFT) ($p = 0.0002$) ve hayatta kalma sürelerinin ($p = 0.006$) daha kısa olduğu bulunmuştur. BAP testi değerleri ≥ 2155 $\mu\text{mol/L}$ olan KLL hastalarında daha kısa TFT ($p = 0.008$) ve daha kısa sağkalım ($p = 0.003$) süreleri tespit edilmiştir. Yazarlar; oksidatif stresin, eş zamanlı olarak reaktif oksijen metabolitlerinin üretimini arttırarak ve antioksidan savunmaları azaltarak KLL hastalarını etkileyebileceğini ifade etmişlerdir (160).

Gaman ve ark. oksidatif stresin rolü ve antioksidanların KLL' nin enfeksiyöz komplikasyonlarının insidansı üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmaya 84 KLL tanılı hasta alınmıştır. Bu hastaların 44 tanesine sadece antilösemik tedavi verilmişken, 40 tanesine ise antilösemik tedavi ile birlikte antioksidan tedavi de verilmiştir. Her iki gruptaki hastalar tanı anındaki ve tedavi sonrası FORD değerleri (antioksidan kapasite testi) ve FORT değerleri (serbest oksijen radikal testi) ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta; antioksidanların uygulanmasının, bağışıklık tepkisini ve

kemoterapiye toleransı uyardığını ve KLL'deki enfeksiyöz komplikasyonların sayısını azalttığını bulmuşlardır. Sağlıklı bir yaşam tarzının (doğal antioksidanlar, C vitamini, E vitamini, selenyum, çinko ve bakır açısından zengin meyve, sebze, kabuklu yemişler ve tohumlardan oluşan bir diyet, sigara ve kirleticilerden kaçınmak ve alkol tüketimini sınırlamak) bulaşıcı komplikasyon riskini azalttığını ve bu hastaların yaşam kalitesini arttırabileceğini ifade etmişlerdir (161).

Dong ve ark. lösemide oksidatif stres ve antioksidan tedaviyi inceledikleri bir araştırma yapmışlardır. KLL hastalarında oksidasyon düzeyini, kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek, antioksidan kapasite düzeyini ise, kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulmuşlardır. Bu sonuçlar bizim çalışmamızdaki ve literatürdeki diğer benzer çalışmalarındaki sonuçlarla uyumludur. Yazarlar, günümüzde lösemnin ön tedavisi için standart kemoterapi stratejilerinin hala birçok sınırlaması olduğunu ve bu nedenle, lösemi tedavisinde antioksidanların ve oksidanların kullanılmasına ilişkin yeni tedavi stratejilerinin hala keşfedilmesi gerektiğini belirtmişlerdir (162).

Moran ve ark. KLL'de serum albümin ve otokrin katalazın sitoprotektif antioksidan aktivitesini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda; KLL hücrelerinin spontan apoptozunun oksidatif stresten kaynaklandığını, KLL hücrelerinin oksidatif stresi ve spontan apoptozu önlemek için gerekli olan hücre içi antioksidan savunmalardan yoksun olduğunu, hücre dışı albümin veya katalazın, hücre içi oksidatif stresi azaltabileceğini ve KLL hücrelerinin in vitro hayatta kalmasını sağlayabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca; albüminin dolaşımdaki KLL hücreleri için sitoprotektif bir antioksidan olarak işlev görebileceğini ve malign lenfositlerden üretilen hücre dışı katalazın da, infiltre dokularda benzer bir işlev görebileceğini düşünmüşlerdir (163).

Ortin ve ark. erken evre KLL hastalarında oksidatif stresin değerlendirilmesi ve prognostik faktörlerle korelasyonu amacıyla bir çalışma yapmışlardır. 37 erken evre KLL hastasının, yakın zamanda tanımlanmış bir oksidatif stres skoru (SOS) aracılığıyla genel oksidatif stres durumunu değerlendirmişler ve sağlıklı bireylerden oluşan bir kontrol grubu ile karşılaştırmışlardır. Erken evre KLL hastalarında, sağlıklı kontrol grubundan önemli ölçüde daha yüksek SOS ile antioksidan/prooksidan oranında bir dengesizlik gözlemlemişler ($0.00 \pm 0.53 - 2.97 \pm 1.13$; $p < 0.05$). Olumsuz prognoz faktörü ≥ 3 olan hastalarda oksidatif stres biyobelirteçleri ve SOS

değerlerinin daha yüksek olduğunu görmüşler. Bu verilerle, bilinen prognoz faktörleri ve oksidatif stres biyobelirteçlerinin, erken evre KLL hastalarında kombine kullanılmasını önermişlerdir (164).

Jitschin ve ark. mitokondriyal metabolizmanın oksidatif strese katkısı ve KLL'de terapötik hedefleri araştırdıkları bir çalışma yapmıştır. Çalışmaya 75 tedavi edilmemiş KLL hastası ve 16 sağlıklı alınmıştır. Oksidatif biyobelirteç olarak DNA (8-OHdG) ve lipid (MDA, TBARS) oksidasyon ürünleri kullanılmış. Bu çalışmada, KLL hücrelerinin mitokondrilerinin, hastaların bağışıklık değişikliklerine bağlı oksidatif stresleri için önemli bir kaynak olduğunu göstermişlerdir. Yazarlar, metabolik yolların hedeflenmesiyle, halihazırda var olan terapötik yaklaşımların etkinliğinin artırılıp, KLL'deki ilaç dirençlerinin üstesinden gelmesine yardımcı olabileceğini vurgulamışlardır (165).

Salimi ve ark. Akasetin'in KLL'ye karşı hem in vivo hem de in vitro metodlarla seçici antikanser aktivitesini inceledikleri "oksidatif stres ve kanserli mitokondrinin anahtar rolü" başlıklı bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmaya son 6 ay içinde herhangi bir tedavi almamış, evre III-IV 10 hasta ile yaş ve cinsiyet uyumlu 10 sağlıklı dahil edilmiştir. Çalışma sonucunda, Akasetin'in kanserli mitokondri ve KLL tedavisinde, ROS oluşumunu hedef alarak oldukça seçici bir şekilde KLL B-lenfosit biriktirdiğini ve öldürdüğünü göstermişlerdir (166). KLL'de oksidatif stres mekanizmaları ve metabolik yolların incelenmesi ve bu konudaki klinik çalışmaların artmasıyla, ilerleyen dönemlerde bu mekanizmalar üzerinden etki edecek yeni tedavilerin ortaya çıkabileceğini düşünüyoruz.

Arslan ve ark. tarafından primer ve metastatik karaciğer kanserli hastalarda lipid peroksidasyon ve bazı antioksidan enzim aktivitelerini araştırdıkları bir çalışma yapılmıştır. Çalışmaya 25 primer ve metastatik karaciğer kanserli hasta ve 15 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarında MDA, SOD, GSH, GPx aktivite düzeyleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda hasta grubunda kontrol grubuna göre serum MDA düzeyi daha yüksek, eritrosit SOD, GSH ve GPx aktiviteleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). Sonuç olarak; karaciğer kanserinin oksidatif stres ile ilişkili olduğunu ve oksidatif stresin önemli bir göstergesi olan antioksidan sistemin zayıfladığını, lipid peroksidasyon seviyelerinin arttığını göstermişlerdir (167). Bu

çalışmanın sonuçları da, solid organ tümörlerinde oksidatif stres göstergelerinin, literatürde KLL hastaları üzerinde yapılan çalışma sonuçlarıyla benzerlik taşıdığını göstermektedir.

Protein, karbonhidrat ve lipidlerin uğradığı oksidatif süreçler gibi, DNA da kararlı yapısına rağmen bu durumdan etkilenmektedir. İnsanda bu süreçlerin, hücrelerin her birinde günde 10^3 defa yaşandığı belirtilmektedir. DNA onarım süreçleri nedeniyle, sağlıklı kişilerde bile oksidatif hasar tespit edilebilmektedir (168). DNA'da guanin bazında hidroksi radikalının 8.pozisyonda etkileşmesi ile baz mutasyonları içinde en çok bilinen 8-OHdG oluşmaktadır (169). 8-OHdG, ROS'un DNA üzerinde oluşturduğu oksidatif baz hasar ürününden biridir. Serum ve idrarda 8-OHdG düzeyi, oksidatif stres belirteci olarak değerlendirilmektedir (170). ROS'ların yarılanma ömürleri kısadır ve bu yüzden ROS'ların direkt in vivo ölçümü zor olmaktadır. Şu anda, DNA üzerinde oluşan oksidatif stresi değerlendirmek için kullanılan 8-OHdG, ROS'un kendisi yerine kullanılan birkaç ROS aracılı üründen biridir (171). Bu çalışmamızda vücutta oluşan total oksidatif strese ek olarak, 8-OHdG düzeyini ölçerek, KLL'nin ROS ürünleri ile DNA üzerinde oluşturmuş olduğu etkileri göstermeyi ve DNA hasar onarım mekanizması üzerindeki çalışmalara da katkı sağlamayı amaçlıyoruz.

Oltra ve ark. tarafından KLL'de oksidatif stres parametrelerinin incelendiği yukarıda anlatılan çalışmada, 8-okso-dG değerleri de araştırılmıştır. Bu çalışmada, transforme lenfositlerde MDA ve 8-okso-dG'nin arttığını, konsantrasyon değişikliklerinin hastalığın süresi ile pozitif korelasyon gösterdiğini gözlemlemişler. Bu hücrelerde daha yüksek 8-okso-dG seviyelerinin, DNA'yı onarma kapasitesinin azalmasıyla veya DNA hasarına karşı artan bir duyarlılıkla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (148). Bizim çalışmamızda olgu ve kontrol grubu arasında 8-OHdG düzeyleri arasında fark yoktu (6,3'e karşı 7,7 ng/ml, $p=0.809$). Çalışmamızda, olgu grubunda TOS ve OSİ değeri kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla $p=0.014$ ve $p=0.022$). Vücuttaki total oksidan durum ve oksidan seviyenin DNA üzerindeki etkisinin göstergesi olan 8-OHdG seviyelerinin gruplar arası karşılaştırmasında fark olmayışı; DNA üzerinde hasar oluşturabilecek oksidan miktarın belirsizliği, belli bir ölçüm standardizasyonunun sağlanmaması, deneysel koşullar ve kullanılan ticari kitlerin farklılığından kaynaklanmış olabilir.

Collado ve ark. tarafından KLL'de oksidatif hasarın incelendiği, 55 KLL hastası üzerinde yapılan ve yukarıda anlatılan çalışmada; olumsuz sitogenetik riskli KLL hastalarından alınan B hücrelerinin, ROS'un neden olduğu hasara duyarlı olduğu ve bunun da 8-okso-dG ve/veya lipid peroksidasyon gibi oksitlenmiş DNA bazlarının düzeylerinde artışa yol açtığı gösterilmiştir (156). Collado ve ark.'nın yaptığı ve yukarıda bahsedilen diğer çalışmada da; KLL, MBL ve sağlıklı kontroller arasında oksidatif stres biyobelirteçleri karşılaştırılmıştır. MBL (39,5 8-okso-dG/106 dG, $p < 0.001$) ve KLL (48,4 8-okso-dG/106 dG, $p < 0.001$) hastalarının lenfositlerindeki hasarlı bazların sıklığı, sağlıklı kişilere göre (6.1 8-okso-dG/106 dG) yaklaşık 8 kat daha yüksek tespit edilmiş, idrarda da benzer şekilde hasta gruplarında artmış 8-okso-dG konsantrasyonları saptanmıştır (157).

Honda ve ark. hematolojik bozukluklarda, oksidatif DNA hasarının bir biyolojik belirteci olan idrar 8-OHdG korelasyonunu inceledikleri bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmaya hematolojik hastalığı olan toplam 44 hasta (13'ü malign lenfoma, 11'i yetişkin T hücreli lösemi/lenfoma (ATL), 7'si akut miyeloid lösemi (AML), 3'ü akut lenfoid lösemi (ALL) ve 10'u miyelodisplastik sendrom (MDS) dahil edilmiştir. Kemoterapi öncesi hastalardan idrar örnekleri alınmış ve bu idrar örneklerinin süpernatantları, ELISA kiti kullanılarak 8-OHdG konsantrasyonları açısından incelenmiştir. ATL hastalarında idrar 8-OHdG seviyesi anlamlı olarak yüksek bulunmuş. Düzey, bozukluğa bakılmaksızın kemoterapiden etkilenmiş ve kemoterapiden sonra geçici olarak artmıştır. Üriner 8-OHdG düzeyinin, özellikle lenfomalı hastaların klinik özellikleri ile korele olduğunu tespit etmişler. Düşük PS veya orta-yüksek/yüksek IPI'li lenfoma hastaları, önemli ölçüde yüksek 8-OHdG seviyeleri göstermiş. Yazarlar, bu belirtecin lenfoma hastalarında iyi bir prognostik gösterge olabileceğini öne sürmüşlerdir (172).

Jeliç ve ark. tarafından oksidatif stres ve kanserdeki rolünün incelendiği derlemede, farklı kanser türlerinde oksidatif stresin ölçümü için biyobelirteçler olarak kullanılan 8-OHdG ve MDA araştırılmıştır. Meme, prostat, akciğer, kolon, serviks, over, beyin, mesane, böbrek, tiroid kanseri, ve KLL vakaları analiz edilmiştir. Genel olarak, kanser hastalarında antioksidan enzim seviyeleri daha düşükken, 8-OHdG ve MDA daha yüksek bulunmuş. Sonuçta; bu biyobelirteçlerin oksidatif stres seviyelerini belirlemede yararlı bir araç olduğunu belirtmişlerdir (173). Oliva ve ark. tarafından

İspanyol topluluğu üzerinde yapılan bir çalışmada, kolorektal tümör dokusunda DNA oksidasyon ürünü 8-okso-dG'nin artmış düzeylerinin, hücreleri genetik olarak dengesiz hale getirdiği ve daha yüksek invazyona ve metastatik potansiyele yol açan moleküler olayların birikmesine duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (147). Her iki çalışma, diğer organ tümörlerinde de KLL ile uyumlu sonuçlara ulaşıldığını göstermektedir.

Comet assay (kuyruklu yıldız tetkiki), veya bilinen diğer ismiyle tek hücre jel elektroforezi, ökaryotik hücrelerde DNA hasar ve onarımını ölçmekte kullanılan basit bir yöntemdir (174). DNA üzerindeki hasarı; genotoksik, sitotoksik ve oksidatif stresin etkilerini de birleştirerek ölçüm yapan comet assay metodu ile değerlendirmek mümkündür. Ekonomik, güvenilir ve hızlı sonuç veren bir tekniktir (175). Bu tetkikte, 'kuyruklu yıldız' içindeki DNA'nın şekli, boyutu ve miktarı, hasar düzeyinin tespitinde önemli rol oynamaktadır. Bu tahlilde DNA hasar parametreleri; kuyruk uzunluğu, yoğunluğu ve momenti ile baş uzunluğu ve yoğunluğu ölçülerek yapılır. Bu parametrelerin çalışılması, ilgili yazılımlar kullanılarak yapılmaktadır. Hasarın derecesine göre, DNA kırıkları nükleustan perifere doğru hareketlenir ve merkezden kenara doğru uzama olur. Sonuçta, hasarın arttığı hücrelerde kuyruklu yıldız (comet) görünümü oluşmaktadır (176).

Mylyperkiö ve ark. comet tetkiki kullanılarak ölçülen, UV ile indüklenen DNA hasarının eksizyon onarımı kinetiğini inceledikleri bir çalışma yapmışlardır. Çalışmaya 36 KLL hastası ve 8 sağlıklı donör dahil edilmiştir. Bu çalışmada, KLL'li hastalardan alınan tek tek hücrelerde ve sağlıklı gruptan alınan mononükleer hücrelerde UV ışınması sonrası eksizyon onarımı kinetiğini göstermişler. Medyan değerler hemen hemen aynı olmasına rağmen, KLL hücrelerinin ID80 (hücrelerin yaşayabilirliğinde %80'lik bir azalmaya neden olan hesaplanmış bir doz) değerlerinde normal kan hücrelerinininkinden daha fazla değişiklik görmüşler. Bu bulgulara dayanarak, ışınlamadan 24 saat sonra uzun tail length değerine sahip hücrelerin artan sıklığının, tamamlanmamış eksizyon onarım bölgeleri meydana gelen hücreleri, gecikmiş onarımı veya apoptoz geçiren hücrelerin artan insidansını temsil ettiğini ve UV ışınlarına duyarlılıkta olası bir rolü olduğunu öne sürmüşlerdir.

Bizim çalışmamızda DNA hasarı comet yöntemi ile ölçüldü ve değerler head length, tail length, head intensity, tail intensity, tail moment, tail migration olarak kaydedildi. Olgu grubunda tail length, tail intensity, tail moment ve tail migration değeri kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla $28,3 \pm 5,8$ 'e karşı $24,4 \pm 6,0$ μm , $p=0.002$; $23,6 \pm 11,3$ 'e karşı $16,5 \pm 9,1$ %, $p=0.003$; $3,9 \pm 2,3$ 'e karşı $2,6 \pm 2,0$, $p=0.005$; ve $13,9 \pm 5,5$ 'e karşı $9,7 \pm 5,9$ $p=0.000$). Olgu grubunda head intensity değeri kontrol grubundan anlamlı olarak daha düşüktü ($76,4 \pm 11,3$ 'e karşı $83,5 \pm 9,1$ %, $p=0.003$). Olgu ve kontrol grubu arasında head length değeri anlamlı farklılık göstermemiştir ($29,0 \pm 2,0$ 'a karşı $29,3 \pm 2,3$ μm , $p>0.05$). Dolayısıyla KLL hastalarında DNA hasarı kontrol grubuna göre artmıştır. Bizim çalışmamızın verileri Myllyperkiö ve ark.'nın yaptığı çalışmanın sonuçlarını destekler niteliktedir.

Kurinnyi ve ark. KLL'li hastalardan ve sağlıklı bağışçılardan alınan lenfositlerin kokültivasyonu altında, ışınlama yoluyla tümörün modifikasyonunu araştırdıkları bir çalışma yapmışlardır. Sağlıklı kişilerden ve KLL hastalarından alınan kan örneklerinin, ayrı ayrı ve birlikte ekimini gerçekleştirmişler. Comet testi kullanarak DNA hasarının bağlı düzeyini değerlendirmişler. Sağlıklı bireylerin periferik kan lenfositleri kültüründe, KLL hastalarının malign hücreleri ile birlikte kültüründen sonra, DNA hasarı düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p<0,001$) gözlemişler. Sonuç olarak; KLL'li hastaların ışınlanmış kan hücrelerinin etkisiyle, sağlıklı bireylerin lenfositlerinde tümör kaynaklı etkinin artmasına neden olduğunu ifade etmişlerdir (177). Bu çalışmanın sonuçları ile, bizim çalışmamızdaki KLL'ye ait malign hücrelerde DNA hasarının arttığı sonucu uyumludur.

Tuck ve ark. KLL lenfositlerinin ultraviyole C (UVC) kaynaklı lezyonları onarma kapasitesini inceledikleri bir araştırma yapmışlardır. Çalışmaya 10 KLL hastası ve 10 sağlıklı gönüllü dahil edilmiş. KLL hastalarından ve sağlıklı gruptan alınan hücreleri UVC ile ışınlanmışlar. Tek sarmal kopmalarının ve alkali kararsız bölgelerin sayısı comet analizi ile belirlenmiş. Yeni izole edilen, işlenmemiş sağlıklı lenfositleri, comet tahlilinde kontrol hücreleri olarak kullanmışlar. Işınlanmamış hücreler için, iki hücre tipi arasında kuyruklu yıldız oluşumunda önemli bir fark dikkati çekmemiştir. Bununla birlikte, ışınlanmış hücreler için, KLL lenfositlerinde, aynı doza tabi tutulan sağlıklı bireylerden alınan hücrelere göre çok daha fazla

miktarda DNA fragmantasyonu görülmüş. Hem sağlıklı donörlerden hem de KLL hastalarından alınan hücreler için, DNA hasarının boyutunun dozla arttığını bulmuşlar. Sağlıklı hücrelerde, UVC ile indüklenen lezyonların onarımı, kuyruklu yıldız oluşumunu 4 saat içinde önemli ölçüde azaltmış, ancak KLL hastalarından alınan hücrelerde 48 saat sonra bile hiçbir değişiklik olmadığı görülmüştür. KLL hastalarından alınan hücrelerin UVC'ye aşırı duyarlı olduğu saptanmıştır. Sağlıklı hücreler üzerinde gözlemlenebilir bir etkisi olmayan dozların onda birinden daha düşük dozlarda, KLL hücreleri azalmış metabolizma sergilemiştir. Bu sonuçlarla; bu aşırı duyarlılığın muhtemelen KLL hücrelerinin UVC kaynaklı DNA hasarını onaramamasından kaynaklandığını belirtmişlerdir (178).

Yamauchi ve ark. KLL lenfositlerinde 4-hidroperoksisiklofosfamid (4-HC) tarafından başlatılan DNA onarımının, fludarabin ve klofarabin tarafından inhibe edilmesini inceledikleri bir çalışma yapmışlardır. KLL'li 50 hastadan alınan ve alkilleyici ajanlara dirençli olmayan lenfositler, fludarabin nükleosit (F-ara-A) veya klofarabin (Cl-F) ile önceden inkübasyon yapılarak veya yapılmadan in vitro 4-HC ile tedavi edilmiş. DNA hasar onarım kinetiği, tek hücreli jel elektroforez (comet) deneyi ile belirlenmiş. KLL lenfositleri, 4-HC'ye yanıt olarak derhal eksizyon onarımını başlatıp tamamlamıştır. 10 mikrom F-ara-A veya 10 mikrom Cl-F-ara-A ile 2 saatlik ön inkübasyon, 50 mikrom F-ara-ATP veya 5 mikrom Cl-F-ara-ATP hücre içi konsantrasyonlarda inhibisyon zirvesine ulaşarak, 4-HC tarafından başlatılan onarımı inhibe etmiştir. 4-HC'yi F-ara-A veya Cl-F-ara-A ile birleştirmek, her birinin tek başına toplamından daha fazla apoptotik hücre ölümü üretmiştir. Sitotoksitedeki artış, DNA kesikinin başlangıç büyüklüğü ve nükleosid analogları tarafından onarım inhibisyonunun derecesi ile orantılı bulunmuştur. Araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak; onarım inhibisyonu ile hücre ölümünün indüklenmesi arasında yakın bir ilişki olduğunu düşünmüşlerdir. Ayrıca; KLL lenfositlerinde aktif olan DNA onarımının, nükleosid analoglarının dahil edilmesini kolaylaştırmak ve bunların sitotoksitesini artırmak için biyolojik bir hedef olabileceğini ve bu nedenle, dirençli hastalıkla ilişkili artan onarım kapasitesinin, terapötik avantaj için manipüle edilebileceğini öne sürmüşlerdir (179).

Jurczyszyn ve ark. multipl miyelom (MM) hastalarında eritrosit membran yağ asitlerini inceledikleri bir çalışma yapmışlardır. Çalışmaya, yaşları 47 ile 85 (ortalama

61) arasında değişen 21 erkek ve 22 kadın olmak üzere, patolojik MM tanısı almış ve kemik iliğinde plazmositozu %16 ila %64 (ortalama %36) olan 43 hasta ile; yaşları 35 ile 78 (ortalama 52) arasında değişen 13 erkek ve 8 kadın olmak üzere 21 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Eritrosit membranlarındaki yağ asidi profilinin MM hastalarında kontrollere göre anlamlı farklılık gösterdiğini; eritrosit membranının n-3/n-6 oranının olgu grubunda anlamlı olarak daha düşük ve satüre yağ asidi (SFA) indeksinin MM hastalarında kontrollere göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu; kontrollere kıyasla MM hastalarının eritrosit zarlarında bireysel yağ asidi varyantlarının belirgin bir şekilde kümelendiğini bulmuşlardır. Yazarlar, endojen n-3 poliunsatüre yağ asitlerinin (PUFA) eksikliğinin, hücre zarlarının fizikokimyasal özelliklerinde değişikliklere, proinflamatuvar ve vazokonstriktif eikosanoitlerin sentezinin aktivasyonuna ve son olarak neoplastik hastalıkların gelişme ve ilerlemesinde önemli olabilecek bir proinflamatuvar durumun indüklenmesine yol açabileceğini ifade etmişlerdir. MM hastalarına profilaktik olarak, n-3 yağ asitleri açısından zengin bir diyet önermişlerdir (180).

Bizim çalışmamızda eritrosit membranındaki 4 farklı monounsatüre yağ asidi (MUFA) incelenmiş, her bir yağ asidinin yüzdeleri verilmiştir. Çalışmamızda incelenen eritrosit membran lipidleri içinde, olgu grubunda nonadekanoat (%22,7) kontrol grubuna göre (%10,0) daha yüksek olduğu saptanmıştır (p=0.733). Hekzadekanoat ise kontrol grubunda yüksek bulunurken (%30,0) olgu grubunda ise azaldığı (%27,3) görülmüştür (p=0.733). Oktadekanoat da aynı şekilde kontrol grubunda yüksek (%30,0) olgu grubunda ise düşük (%27,3) bulunmuştur (p=0.733). Tetradekanoat düzeyleri de kontrol grubunda yüksek (%30,0) olgu grubunda azalmış (%22,7) olarak tespit edilmiştir (p=0.733). Olgu ve kontrol grubu arasında çalışmaya alınan MUFA'lar karşılaştırıldığında; olgu grubunda (%15,9), kontrol grubuna (%30) göre azalmış olduğu görülmektedir (p=0.641).

Morimoto ve ark. eritrosit membranı yağ asidi bileşimi, serum lipidleri ve non-Hodgkin lenfoma (NHL) riskini araştırdıkları çok ırklı bir kohort çalışması yapmışlardır. Kohort, 1993-1996 yılları arasında, Hawaii ve Los Angeles'ta, 5 etnik gruptan (beyazlar, Japon Amerikalılar, Latinler, Afro- Amerikalılar ve Hawaii yerlileri) toplanmıştır. Özetle; daha yüksek eritrosit membran satüre yağ asidi (SFA) seviyelerinin, NHL riski üzerindeki olumsuz etkisine dair destekleyici kanıtlar

sunmuşlardır. Ayrıca, dolaşımdaki toplam kolesterol ve HDL seviyelerinin, lenfomagenez ile ilişkili enflamasyonun biyobelirteçleri olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (181).

Korat ve ark. eritrosit membranı trans yağ asidi (TFA) seviyeleri ve NHL riskini araştırdıkları prospektif bir olgu kontrol çalışması yapmışlardır. Çalışmaya, 160 KLL/SLL, 98 DLBCL, 87 FL, 120 diğer B-NHL ve 25 T-NHL ve ayrıca 583 kontrol dahil olmak üzere 583 doğrulanmış NHL vakası (332 kadın ve 251 erkek) dahil edilmiştir. Çalışma sonunda, eritrosit membran TFA düzeylerinin NHL riskiyle, (özellikle DLBCL) önemli pozitif ilişkileri gözlemlenmiştir. Yazarlar bu sonuca dayanarak, NHL etiolojisinde diyetin rolünün daha fazla aydınlatılması gerektiğini vurgulamışlardır (182).

Amézaga ve ark. kanser hastalarında değişen eritrosit membran yağ asidi profilini inceledikleri bir çalışma yapmışlardır. Araştırmaya 54 kanser hastası (20'si meme, 13'ü kolon, 9'u akciğer, 4'ü prostat, 2'si over kanseri, 1'i lenfoma ve 5'i de diğer kanserler) ve 37 kontrol dahil edilmiştir. Her iki grubun eritrosit membran fosfolipitleri ve yağ asidi profili karşılaştırılmış. Diyet alışkanlıkları, onaylanmış bir gıda sıklığı anketi kullanılarak değerlendirilmiş. Düzeltilmiş Kovaryans Testi Analizi (ANCOVA) modeli; kontrollerle karşılaştırıldığında kanser hastalarının SFA'larının (C16:0 (%5,7); C18:0 (%15,9)) daha düşük ve MUFA'larının (9c-C18:1 (%12,9) ve 11c-C18:1 (%54,5)) daha yüksek olduğunu ortaya çıkarmıştır. Buna paralel olarak, desatüröz enzimatik indeksinin (delta-9 desatüröz ($\Delta 9D$), +%28,3) ve membran doygunluk indeksinin (SI = SFA/MUFA; -%27,3) benzer şekilde modüle edildiğini gözlemlenmiştir. PUFA aileleri; n-6 C20:4 ve n-3 PUFA'da (dokosaheksaenoik asit (DHA) ve eikosapentaenoik asit (EPA)) fark olmaksızın n-6 C18:2 ve C20:3'te (sırasıyla %15,7 ve %22,2) artış göstermiştir. Bu değişikliklerin yiyeceklerden ve diyetle yağ alımından bağımsız olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar; eritrosit membran lipit profilinin, kanser hastalarında diyet alışkanlıklarından bağımsız olarak artan desatürasyon aktivitesi ve omega-6'nın metabolik izini tespit etmek için yararlı olduğunu vurgulamışlardır (183).

Literatür tarandığında, KLL hastalarında eritrosit membran lipit profilini inceleyen başka bir çalışmaya rastlanmadı. Bizim çalışmamız, bu konuyu inceleyen

ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. Sonuçlarımız arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmayışı, membran lipitlerinin değerlendirildiği örneklem sayısının azlığı ile ilişkili olabileceği gibi, olgu grubunda hastalık sürecinin uzunluğu da bu durumu etkileyebilmektedir. Bu nedenlerle, bu konuda daha büyük örneklem gruplarında ileri araştırmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

6. SONUÇLAR

1. KLL grubunda TOS ve OSİ değeri kontrol grubundan daha yüksek saptandı. TAS değeri gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi.
2. KLL ve kontrol grubu arasında 8-OHdG düzeyi farklılık göstermedi.
3. KLL grubunda tail length, tail intensity, tail moment ve tail migration değeri kontrol grubundan yüksek, head intensity değeri kontrol grubundan düşük saptandı. Head length gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi.
4. KLL ve kontrol grubu arasında membran yağ asitleri düzeyi farklılık göstermedi.

KAYNAKLAR

1. Mukkamalla SKR, Taneja A, Malipeddi D, Master SR. Chronic Lymphocytic Leukemia. In Treasure Island (FL); 2022.
2. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Prim.* 2017 Jan;3:16096.
3. Chiorazzi N, Chen S-S, Rai KR. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2021 Feb;11(2).
4. Ghia P, Ferreri AM, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007 Dec;64(3):234–46.
5. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, Hillmen P, Houlston RS, Kay N, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol.* 2005 Aug;130(3):325–32.
6. Shanafelt TD, Ghia P, Lanasa MC, Landgren O, Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia.* 2010 Mar;24(3):512–20.
7. Kalpadakis C, Pangalis GA, Sachanas S, Vassilakopoulos TP, Kyriakaki S, Korkolopoulou P, et al. New insights into monoclonal B-cell lymphocytosis. *Biomed Res Int.* 2014;2014:258917.
8. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJM, Kwok M, Fenton JAL, Plummer M, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2008 Aug;359(6):575–83.
9. Fazi C, Scarfò L, Pecciarini L, Cottini F, Dagklis A, Janus A, et al. General population low-count CLL-like MBL persists over time without clinical progression, although carrying the same cytogenetic abnormalities of CLL. *Blood.* 2011 Dec;118(25):6618–25.

10. Nieto WG, Almeida J, Romero A, Teodosio C, López A, Henriques AF, et al. Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood*. 2009 Jul;114(1):33–7.
11. Rawstron AC, Yuille MR, Fuller J, Cullen M, Kennedy B, Richards SJ, et al. Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood*. 2002 Oct;100(7):2289–90.
12. Marti GE, Carter P, Abbasi F, Washington GC, Jain N, Zenger VE, et al. B-cell monoclonal lymphocytosis and B-cell abnormalities in the setting of familial B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2003 Mar;52(1):1–12.
13. de Tute R, Yuille M, Catovsky D, Houlston RS, Hillmen P, Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) in CLL families: substantial increase in relative risk for young adults. Vol. 20, *Leukemia*. England; 2006. p. 728–9.
14. Goldin LR, Lanasa MC, Slager SL, Cerhan JR, Vachon CM, Strom SS, et al. Common occurrence of monoclonal B-cell lymphocytosis among members of high-risk CLL families. *Br J Haematol*. 2010 Oct;151(2):152–8.
15. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):9–29.
16. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Niemann CU, Kater AP, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Vol. 32, *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. England; 2021. p. 23–33.
17. S.F. Altekruse, C.L. Kosari, M. Krapcho et al., eds. Bethesda M. *SEER Clinical Statistics Review, 1975-2007*. 2010.
18. Cronin KA, Ries LAG, Edwards BK. The Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program of the National Cancer Institute. Vol. 120 Suppl, *Cancer*. United States; 2014. p. 3755–7.

19. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 2017 Apr;3(4):524–48.
20. Hernández JA, Land KJ, McKenna RW. Leukemias, myeloma, and other lymphoreticular neoplasms. *Cancer.* 1995 Jan;75(1 Suppl):381–94.
21. Wu S-J, Huang S-Y, Lin C-T, Lin Y-J, Chang C-J, Tien H-F. The incidence of chronic lymphocytic leukemia in Taiwan, 1986-2005: a distinct increasing trend with birth-cohort effect. *Blood.* 2010 Nov;116(22):4430–5.
22. Blair A, White DW. Leukemia cell types and agricultural practices in Nebraska. *Arch Environ Health.* 1985;40(4):211–4.
23. Burmeister LF, Van Lier SF, Isacson P. Leukemia and farm practices in Iowa. *Am J Epidemiol.* 1982 May;115(5):720–8.
24. Talibov M, Auvinen A, Weiderpass E, Hansen J, Martinsen J-I, Kjaerheim K, et al. Occupational solvent exposure and adult chronic lymphocytic leukemia: No risk in a population-based case-control study in four Nordic countries. *Int J cancer.* 2017 Sep;141(6):1140–7.
25. Arp EWJ, Wolf PH, Checkoway H. Lymphocytic leukemia and exposures to benzene and other solvents in the rubber industry. *J Occup Med Off Publ Ind Med Assoc.* 1983 Aug;25(8):598–602.
26. Monson RR, Fine LJ. Cancer mortality and morbidity among rubber workers. *J Natl Cancer Inst.* 1978 Oct;61(4):1047–53.
27. Yuille MR, Matutes E, Marossy A, Hilditch B, Catovsky D, Houlston RS. Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *Br J Haematol.* 2000 Jun;109(4):794–9.

28. Goldin LR, Björkholm M, Kristinsson SY, Turesson I, Landgren O. Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2009 May;94(5):647–53.
29. Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res*. 1994 Feb;137(2 Suppl):S68-97.
30. Schubauer-Berigan MK, Daniels RD, Fleming DA, Markey AM, Couch JR, Ahrenholz SH, et al. Chronic lymphocytic leukaemia and radiation: findings among workers at five US nuclear facilities and a review of the recent literature. *Br J Haematol*. 2007 Dec;139(5):799–808.
31. Kikushige Y, Miyamoto T. Pre-malignant lymphoid cells arise from hematopoietic stem/progenitor cells in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Hematol*. 2015 Nov;102(5):528–35.
32. Damm F, Mylonas E, Cosson A, Yoshida K, Della Valle V, Mouly E, et al. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov*. 2014 Sep;4(9):1088–101.
33. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*. 1997 Oct;108(4):378–82.
34. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol*. 1998 May;51(5):364–9.
35. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, 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 Jun;111(12):5446–56.

36. Landgren O, Albitar M, Ma W, Abbasi F, Hayes RB, Ghia P, et al. B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2009 Feb;360(7):659–67.
37. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2011 Aug;20(2):246–59.
38. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan X-J, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood*. 2002 Jun;99(11):4087–93.
39. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*. 2004 Jun;103(12):4389–95.
40. Bagnara D, Mazzarello AN, Ghiotto F, Colombo M, Cutrona G, Fais F, et al. Old and New Facts and Speculations on the Role of the B Cell Receptor in the Origin of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2022 Nov;23(22).
41. Parikh SA, Leis JF, Chaffee KG, Call TG, Hanson CA, Ding W, et al. Hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia: Natural history, clinical correlates, and outcomes. *Cancer*. 2015 Sep;121(17):2883–91.
42. Wadhwa PD, Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 2006 Apr;33(2):240–9.
43. Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, Jenkins RB, Paternoster SF, Smoley SA, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006 Oct;24(28):4634–41.
44. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000 Dec;343(26):1910–6.

45. Reddy KS. Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel. *Br J Haematol*. 2006 Mar;132(6):705–22.
46. Grubor V, Krasnitz A, Troge JE, Meth JL, Lakshmi B, Kendall JT, et al. Novel genomic alterations and clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia revealed by representational oligonucleotide microarray analysis (ROMA). *Blood*. 2009 Feb;113(6):1294–303.
47. Binder M, Léchenne B, Ummanni R, Scharf C, Balabanov S, Trusch M, et al. Stereotypical chronic lymphocytic leukemia B-cell receptors recognize survival promoting antigens on stromal cells. *PLoS One*. 2010 Dec;5(12):e15992.
48. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*. 1994 Oct;8(10):1640–5.
49. Packham G, Krysov S, Allen A, Savelyeva N, Steele AJ, Forconi F, et al. The outcome of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia: proliferation or anergy. *Haematologica*. 2014 Jul;99(7):1138–48.
50. Vardi A, Agathangelidis A, Sutton L-A, Ghia P, Rosenquist R, Stamatopoulos K. Immunogenetic studies of chronic lymphocytic leukemia: revelations and speculations about ontogeny and clinical evolution. *Cancer Res*. 2014 Aug;74(16):4211–6.
51. Ricciardi MR, Petrucci MT, Gregorj C, Ariola C, Lemoli RM, Fogli M, et al. Reduced susceptibility to apoptosis correlates with kinetic quiescence in disease progression of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2001 May;113(2):391–9.
52. Liu L, Cheng X, Yang H, Lian S, Jiang Y, Liang J, et al. BCL-2 expression promotes immunosuppression in chronic lymphocytic leukemia by enhancing regulatory T cell differentiation and cytotoxic T cell exhaustion. *Mol Cancer*. 2022 Feb;21(1):59.

53. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Jan;117(2):563–74.
54. Correa H. Li-Fraumeni Syndrome. *J Pediatr Genet*. 2016 Jun;5(2):84–8.
55. Pflaum J, Schlosser S, Müller M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol*. 2014;4:285.
56. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. Vol. 358, *Nature*. England; 1992. p. 15–6.
57. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. Vol. 408, *Nature*. England; 2000. p. 307–10.
58. Blattner C, Hay T, Meek DW, Lane DP. Hypophosphorylation of Mdm2 augments p53 stability. *Mol Cell Biol*. 2002 Sep;22(17):6170–82.
59. Kim HS, Choi SI, Min HL, Kim MA, Kim WH. Mutation at intronic repeats of the ataxia-telangiectasia mutated (ATM) gene and ATM protein loss in primary gastric cancer with microsatellite instability. *PLoS One*. 2013;8(12):e82769.
60. Bartkova J, Bakkenist CJ, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Sehested M, Lukas J, et al. ATM activation in normal human tissues and testicular cancer. *Cell Cycle*. 2005 Jun;4(6):838–45.
61. KLL Tanı ve Tedavi Kılavuzu [Internet]. Türk Hematoloji Derneği. 2012. p. 3–13. Available from: www.thd.org.tr
62. Kronik Lenfositik Lösemi [Internet]. Hematoloji Uzmanlık Derneği. 2023. Available from: www.kll.org.tr
63. Deveci F, Kırkıl G, Kuluöztürk M, Çalık İ, Öner Ö. Kronik Lenfositik Lösemili Bir Olguda Pulmoner Lenfositik İnfiltrasyon. *Respir Case Reports*. 2018;7(3):149–53.

64. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975 Aug;46(2):219–34.
65. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981 Jul;48(1):198–206.
66. Agnew KL, Ruchlemer R, Catovsky D, Matutes E, Bunker CB. Cutaneous findings in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Dermatol*. 2004 Jun;150(6):1129–35.
67. Strati P, Uhm JH, Kaufmann TJ, Nabhan C, Parikh SA, Hanson CA, et al. Prevalence and characteristics of central nervous system involvement by chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2016 Apr;101(4):458–65.
68. Hanse MCJ, Van't Veer MB, van Lom K, van den Bent MJ. Incidence of central nervous system involvement in chronic lymphocytic leukemia and outcome to treatment. *J Neurol*. 2008 Jun;255(6):828–30.
69. Da'as N, Polliack A, Cohen Y, Amir G, Darmon D, Kleinman Y, et al. Kidney involvement and renal manifestations in non-Hodgkin's lymphoma and lymphocytic leukemia: a retrospective study in 700 patients. *Eur J Haematol*. 2001 Sep;67(3):158–64.
70. Baer MR, Stein RS, Dessypris EN. Chronic lymphocytic leukemia with hyperleukocytosis. The hyperviscosity syndrome. *Cancer*. 1985 Dec;56(12):2865–9.
71. Diehl LF, Ketchum LH. Autoimmune disease and chronic lymphocytic leukemia: autoimmune hemolytic anemia, pure red cell aplasia, and autoimmune thrombocytopenia. *Semin Oncol*. 1998 Feb;25(1):80–97.
72. Tsai H-T, Caporaso NE, Kyle RA, Katzmann JA, Dispenzieri A, Hayes RB, et al. Evidence of serum immunoglobulin abnormalities up to 9.8 years before diagnosis of chronic lymphocytic leukemia: a prospective study. *Blood*. 2009 Dec;114(24):4928–32.

73. Keating MJ, O'Brien S, Lerner S, Koller C, Beran M, Robertson LE, et al. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood*. 1998 Aug;92(4):1165–71.
74. 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 Jun;131(25):2745–60.
75. KLL'de periferik yayma ve kemik iliği bulguları [Internet]. Hematoloji Uzmanlık Derneği. Available from: www.hematolojياتlasi.com
76. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. 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;99(24):15524–9.
77. Fujiwara S, Muroi K, Tatara R, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, et al. Clinical features of de novo CD25-positive follicular lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2014 Feb;55(2):307–13.
78. Sandes AF, de Lourdes Chauffaille M, Oliveira CRMC, Maekawa Y, Tamashiro N, Takao TT, et al. CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014 Mar;86(2):98–105.
79. Mason EF, Pozdnyakova O, Li B, Dudley G, Dorfman DM. Flow Cytometric Patterns of CD200 and CD1d Expression Distinguish CD10-Negative, CD5-Negative Mature B-Cell Lymphoproliferative Disorders. *Am J Clin Pathol*. 2017 Jul;148(1):33–41.
80. Mraz M, Chen L, Rassenti LZ, Ghia EM, Li H, Jepsen K, et al. miR-150 influences B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia by regulating expression of GAB1 and FOXP1. *Blood*. 2014 Jul;124(1):84–95.

81. Tsagiopoulou M, Chapaprieta V, Duran-Ferrer M, Moysiadis T, Psomopoulos F, Kollia P, et al. Chronic lymphocytic leukemias with trisomy 12 show a distinct DNA methylation profile linked to altered chromatin activation. Vol. 105, *Haematologica*. Italy; 2020. p. 2864–7.
82. Quijada-Álamo M, Pérez-Carretero C, Hernández-Sánchez M, Rodríguez-Vicente A-E, Herrero A-B, Hernández-Sánchez J-M, et al. Dissecting the role of TP53 alterations in del(11q) chronic lymphocytic leukemia. *Clin Transl Med*. 2021 Feb;11(2):e304.
83. Hallek M, Al-Sawaf O. Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *Am J Hematol*. 2021 Dec;96(12):1679–705.
84. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, Eichhorst BF, Bergmann MA, Elter T, et al. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014 Jul;124(1):49–62.
85. Seiffert M, Dietrich S, Jethwa A, Glimm H, Lichter P, Zenz T. Exploiting biological diversity and genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2012 Jun;53(6):1023–31.
86. Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*. 1997 Apr;89(7):2516–22.
87. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, Wierda WG, Grever MR, Byrd JC, et al. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008 Sep;112(5):1923–30.
88. Baumann T, Moia R, Gaidano G, Delgado J, Condoluci A, Villamor N, et al. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia modern era: a real-life study in 848 unselected patients. *Leukemia*. 2021 Aug;35(8):2325–31.

89. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, Faderl S, Ferrajoli A, Do K-A, et al. Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007 Jun;109(11):4679–85.
90. Rossi D, Cerri M, Capello D, Deambrogi C, Rossi FM, Zucchetto A, et al. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol*. 2008 Jun;142(2):202–15.
91. Stelmach P, Błoński JZ, Wawrzyniak E, Schweiger P, Wilandt A, Majak P, et al. Prognostic value of thymidine kinase activity in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2016 Dec;70(0):1321–30.
92. Lipshutz MD, Mir R, Rai KR, Sawitsky A. Bone marrow biopsy and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 1980 Sep;46(6):1422–7.
93. Bulian P, Shanafelt TD, Fegan C, Zucchetto A, Cro L, Nüchel H, et al. CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2014 Mar;32(9):897–904.
94. Molica S, Vitelli G, Levato D, Gandolfo GM, Liso V. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk of progression in early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1999 Dec;107(3):605–10.
95. KLL Tanı ve Tedavi Kılavuzu [Internet]. Türk Hematoloji Derneği. 2020. p. 82,83. Available from: www.thd.org.tr
96. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. CLL Trialists' Collaborative Group. *J Natl Cancer Inst*. 1999 May;91(10):861–8.
97. Effects of chlorambucil and therapeutic decision in initial forms of chronic lymphocytic leukemia (stage A): results of a randomized clinical trial on 612 patients. The French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 1990 Apr;75(7):1414–21.

98. Dighiero G, Maloum K, Desablens B, Cazin B, Navarro M, Leblay R, et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 1998 May;338(21):1506–14.
99. Shustik C, Mick R, Silver R, Sawitsky A, Rai K, Shapiro L. Treatment of early chronic lymphocytic leukemia: intermittent chlorambucil versus observation. *Hematol Oncol.* 1988;6(1):7–12.
100. O'Brien SM, Keating MJ, MocarSKI ES. Updated guidelines on the management of cytomegalovirus reactivation in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with alemtuzumab. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2006 Sep;7(2):125–30.
101. El Chaer F, Shah DP, Chemaly RF. How I treat resistant cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood.* 2016 Dec;128(23):2624–36.
102. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000 Dec;343(24):1750–7.
103. Robak T, Bloński JZ, Kasznicki M, Blasińska-Morawiec M, Krykowski E, Dmoszyńska A, 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 Oct;96(8):2723–9.
104. Dreger P, Ghia P, Schetelig J, van Gelder M, Kimby E, Michallet M, et al. High-risk chronic lymphocytic leukemia in the era of pathway inhibitors: integrating molecular and cellular therapies. *Blood.* 2018 Aug;132(9):892–902.
105. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet (London, England).* 2010 Oct;376(9747):1164–74.

106. Dreger P, Schetelig J, Andersen N, Corradini P, van Gelder M, Gribben J, et al. Managing high-risk CLL during transition to a new treatment era: stem cell transplantation or novel agents? *Blood*. 2014 Dec;124(26):3841–9.
107. Fischer K, Cramer P, Busch R, Böttcher S, Bahlo J, Schubert J, 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012 Sep;30(26):3209–16.
108. Wierda WG, Kipps TJ, Mayer J, Stilgenbauer S, Williams CD, Hellmann A, et al. Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 Apr;28(10):1749–55.
109. Cartron G, de Guibert S, Dilhuydy M-S, Morschhauser F, Leblond V, Dupuis J, et al. Obinutuzumab (GA101) in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: final data from the phase 1/2 GAUGUIN study. *Blood*. 2014 Oct;124(14):2196–202.
110. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*. 2014 Mar;370(12):1101–10.
111. Leong DP, Caron F, Hillis C, Duan A, Healey JS, Fraser G, et al. The risk of atrial fibrillation with ibrutinib use: a systematic review and meta-analysis. Vol. 128, *Blood*. United States; 2016. p. 138–40.
112. Dickerson T, Wiczer T, Waller A, Philippon J, Porter K, Haddad D, et al. Hypertension and incident cardiovascular events following ibrutinib initiation. *Blood*. 2019 Nov;134(22):1919–28.
113. Abdel-Qadir H, Sabrie N, Leong D, Pang A, Austin PC, Prica A, et al. Cardiovascular Risk Associated With Ibrutinib Use in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Population-Based Cohort Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2021 Nov;39(31):3453–62.

114. Byrd JC, Hillmen P, Ghia P, Kater AP, Chanan-Khan A, Furman RR, et al. Acalabrutinib Versus Ibrutinib in Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia: Results of the First Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2021 Nov;39(31):3441–52.
115. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2016 Jan;374(4):311–22.
116. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Coutre S, Seymour JF, Munir T, et al. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2016 Jun;17(6):768–78.
117. Fischer K, Al-Sawaf O, Bahlo J, Fink A-M, Tandon M, Dixon M, et al. Venetoclax and Obinutuzumab in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *N Engl J Med*. 2019 Jun;380(23):2225–36.
118. Jain N, Keating M, Thompson P, Ferrajoli A, Burger J, Borthakur G, et al. Ibrutinib and Venetoclax for First-Line Treatment of CLL. *N Engl J Med*. 2019 May;380(22):2095–103.
119. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, Benson DM, Flinn IW, Wagner-Johnston ND, et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 δ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014 May;123(22):3390–7.
120. Mato AR, Hill BT, Lamanna N, Barr PM, Ujjani CS, Brander DM, et al. Optimal sequencing of ibrutinib, idelalisib, and venetoclax in chronic lymphocytic leukemia: results from a multicenter study of 683 patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017 May;28(5):1050–6.
121. Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, Villamor N, Letestu R, Nomdedeu J, et al. A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. *Leukemia*. 2016 Apr;30(4):929–36.

122. Kovacs G, Robrecht S, Fink AM, Bahlo J, Cramer P, von Tresckow J, et al. Minimal Residual Disease Assessment Improves Prediction of Outcome in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Who Achieve Partial Response: Comprehensive Analysis of Two Phase III Studies of the German CLL Study Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2016 Nov;34(31):3758–65.
123. Böttcher S. Minimal Residual Disease Quantification in Chronic Lymphocytic Leukemia: Clinical Significance and Flow Cytometric Methods. *Methods Mol Biol*. 2019;1881:211–38.
124. Morrison VA, Rai KR, Peterson BL, Kolitz JE, Elias L, Appelbaum FR, et al. Impact of therapy With chlorambucil, fludarabine, or fludarabine plus chlorambucil on infections in patients with chronic lymphocytic leukemia: Intergroup Study Cancer and Leukemia Group B 9011. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2001 Aug;19(16):3611–21.
125. Reinwald M, Silva JT, Mueller NJ, Fortún J, Garzoni C, de Fijter JW, et al. ESCMID Study Group for Infections in Compromised Hosts (ESGICH) Consensus Document on the safety of targeted and biological therapies: an infectious diseases perspective (Intracellular signaling pathways: tyrosine kinase and mTOR inhibitors). *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2018 Jun;24 Suppl 2:S53–70.
126. Scarfò L, Chatzikonstantinou T, Rigolin GM, Quaresmini G, Motta M, Vitale C, et al. COVID-19 severity and mortality in patients with chronic lymphocytic leukemia: a joint study by ERIC, the European Research Initiative on CLL, and CLL Campus. *Leukemia*. 2020 Sep;34(9):2354–63.
127. Ben-Dali Y, Hleuhel MH, da Cunha-Bang C, Brieghel C, Poulsen CB, Clasen-Linde E, et al. Richter's transformation in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a Nationwide Epidemiological Study. *Leuk Lymphoma*. 2020 Jun;61(6):1435–44.

128. Tsimberidou A-M, O'Brien S, Kantarjian HM, Koller C, Hagemeister FB, Fayad L, et al. Hodgkin transformation of chronic lymphocytic leukemia: the M. D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer*. 2006 Sep;107(6):1294–302.
129. Kharfan-Dabaja MA, Kumar A, Hamadani M, Stilgenbauer S, Ghia P, Anasetti C, et al. Clinical Practice Recommendations for Use of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Chronic Lymphocytic Leukemia on Behalf of the Guidelines Committee of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol blood marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2016 Dec;22(12):2117–25.
130. Mauro FR, Foa R, Cerretti R, Giannarelli D, Coluzzi S, Mandelli F, et al. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: clinical, therapeutic, and prognostic features. *Blood*. 2000 May;95(9):2786–92.
131. Visco C, Ruggeri M, Laura Evangelista M, Stasi R, Zanotti R, Giaretta I, et al. Impact of immune thrombocytopenia on the clinical course of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008 Feb;111(3):1110–6.
132. da Cunha-Bang C, Rostgaard K, Andersen MA, Rotbain EC, Grønbaek K, Frederiksen H, et al. Risk of new malignancies among patients with CLL treated with chemotherapy: results of a Danish population-based study. *Br J Haematol*. 2021 Apr;193(2):339–45.
133. Hisada M, Biggar RJ, Greene MH, Fraumeni JFJ, Travis LB. Solid tumors after chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001 Sep;98(6):1979–81.
134. Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1995 Jan;35(1–2):7–20.
135. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44–84.

136. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 Dec;279(6):L1005-28.
137. Bolisetty S, Jaimes EA. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *Int J Mol Sci*. 2013 Mar;14(3):6306–44.
138. De Bont R, van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*. 2004 May;19(3):169–85.
139. Buhimschi IA, Buhimschi CS, Pupkin M, Weiner CP. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. *Am J Obstet Gynecol*. 2003 Jul;189(1):181–8.
140. Gough DR, Cotter TG. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death Dis*. 2011 Oct;2(10):e213.
141. Scandalios JG. The rise of ROS. *Trends Biochem Sci*. 2002 Sep;27(9):483–6.
142. Polidori MC, Stahl W, Eichler O, Niestroj I, Sies H. Profiles of antioxidants in human plasma. *Free Radic Biol Med*. 2001 Mar;30(5):456–62.
143. Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J Biochem Mol Biol*. 2003 Jan;36(1):95–109.
144. Young IS, Woodside J V. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 2001 Mar;54(3):176–86.
145. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*. 2000 Aug;72(2 Suppl):637S-46S.
146. Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res*. 1991 Feb;51(3):794–8.
147. Oliva MR, Ripoll F, Muñoz P, Iradi A, Trullenque R, Valls V, et al. Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community. *Mol Carcinog*. 1997 Apr;18(4):232–43.

148. Oltra AM, Carbonell F, Tormos C, Iradi A, Sáez GT. Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radic Biol Med*. 2001 Jun;30(11):1286–92.
149. Bakan N, Taysi S, Yilmaz O, Bakan E, Kuşay S, Uzun N, et al. Glutathione peroxidase, glutathione reductase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde concentrations in serum of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Chim Acta*. 2003 Dec;338(1–2):143–9.
150. Jeral Nurhan S. Hedefe yönelik ajanlar ile tedavi edilen kronik lenfositik lösemi hastalarının demografik ve klinik özelliklerinin survi ve prognoz üzerine etkisinin incelenmesi: Retrospektif tek merkez deneyimi. [İstanbul]: Marmara Üniversitesi; 2022.
151. Berk ÖRÜNCÜ M. Kronik lenfositik lösemide immünglobulin ağır zincir mutasyonunun değerlendirilmesi. [Ankara]: Ankara Üniversitesi; 2022.
152. Evran D. Kronik Lenfositik Lösemi hastalarında hipogamaglobulinemi sıklığı ve hipogamaglobulineminin tedavi yanıtları ve komplikasyonları ile sağkalım üzerine etkileri. İstanbul üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi; 2021.
153. Top ZEN, Tez U, Anab H, Yrd MAN. kronik lenfositik lösemi(kll) hastalarında nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (ngal) ve oksidatif stres düzeylerinin değerlendirilmesi. Süleyman Demirel üniversitesi; 2014.
154. Zhevak T, Shelekhova T, Chesnokova N, Tsareva O, Chanturidze A, Litvitsky P, et al. The relationship between oxidative stress and cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Exp Mol Pathol*. 2020 Oct;116:104524.
155. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest*. 2002;62(3):231–6.

156. Collado R, Ivars D, Oliver I, Tormos C, Egea M, Miguel A, et al. Increased oxidative damage associated with unfavorable cytogenetic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Biomed Res Int.* 2014;2014:686392.
157. Collado R, Oliver I, Tormos C, Egea M, Miguel A, Cerdá C, et al. Early ROS-mediated DNA damage and oxidative stress biomarkers in Monoclonal B Lymphocytosis. *Cancer Lett.* 2012 Apr;317(2):144–9.
158. DE Rosa A, Zappavigna S, Villa MR, Improta S, Cesario E, Mastrullo L, et al. Prognostic role of translocator protein and oxidative stress markers in chronic lymphocytic leukemia patients treated with bendamustine plus rituximab. *Oncol Lett.* 2015 Mar;9(3):1327–32.
159. Zelen I, Djurdjevic P, Popovic S, Stojanovic M, Jakovljevic V, Radivojevic S, et al. Antioxidant enzymes activities and plasma levels of oxidative stress markers in B-chronic lymphocytic leukemia patients. *J BUON.* 2010;15(2):330–6.
160. D’Arena G, Vitale C, Perbellini O, Coscia M, La Rocca F, Ruggieri V, et al. Prognostic relevance of oxidative stress measurement in chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol.* 2017 Oct;99(4):306–14.
161. Gaman AM, Buga A-M, Gaman M-A, Popa-Wagner A. The role of oxidative stress and the effects of antioxidants on the incidence of infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:158135.
162. Dong C, Zhang N-J, Zhang L-J. Oxidative stress in leukemia and antioxidant treatment. *Chin Med J (Engl).* 2021 Jul;134(16):1897–907.
163. Moran EC, Kamiguti AS, Cawley JC, Pettitt AR. Cytoprotective antioxidant activity of serum albumin and autocrine catalase in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2002 Feb;116(2):316–28.

164. Ortin, X ; Giralt, M ; Romeu, M ; Lejeune, M ; Nogues, M R ; Sanchez-Martos, V ; Rodriguez-Luaces, M ; Sans, T ; Font L. Oxidative Stress in Patients With Early Stage Chronic Lymphocytic Leukemia, Assessment and Correlation With Prognostic Factors. *J Hematol Elmer Press*. 2012;1(4–5):77–8.
165. Jitschin R, Hofmann AD, Bruns H, Giessl A, Bricks J, Berger J, et al. Mitochondrial metabolism contributes to oxidative stress and reveals therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014 Apr;123(17):2663–72.
166. Salimi A, Roudkenar MH, Sadeghi L, Mohseni A, Seydi E, Pirahmadi N, et al. Selective Anticancer Activity of Acacetin Against Chronic Lymphocytic Leukemia Using Both In Vivo and In Vitro Methods: Key Role of Oxidative Stress and Cancerous Mitochondria. *Nutr Cancer*. 2016;68(8):1404–16.
167. A. Arslan, H. Demir MO and HA. Evaluation of Lipid Peroxidation and Some Antioxidant Activities in Patients with Primary and Metastatic Liver Cancer. *J Cancer Ther*. 2014;5(2):192–7.
168. Halliwell, B; Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd Editio. Oxford University Press; 1999. 936 p.
169. Altınışık M. Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar [Internet]. 2021. Available from: <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01b.pdf>.
170. De Martinis BS, de Lourdes Pires Bianchi M. Methodology for urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine analysis by HPLC with electrochemical detection. *Pharmacol Res*. 2002 Aug;46(2):129–31.
171. Nakano M, Kawanishi Y, Kamohara S, Uchida Y, Shiota M, Inatomi Y, et al. Oxidative DNA damage (8-hydroxydeoxyguanosine) and body iron status: a study on 2507 healthy people. *Free Radic Biol Med*. 2003 Oct;35(7):826–32.
172. Honda M, Yamada Y, Tomonaga M, Ichinose H, Kamihira S. Correlation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), a biomarker of oxidative DNA damage, and clinical features of hematological disorders: a pilot study. *Leuk Res*. 2000 Jun;24(6):461–8.

173. Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, Srdjenovic BU. Oxidative stress and its role in cancer. *J Cancer Res Ther.* 2021;17(1):22–8.
174. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004 Mar;26(3):249–61.
175. Glei M, Schneider T, Schlörmann W. Comet assay: an essential tool in toxicological research. *Arch Toxicol.* 2016 Oct;90(10):2315–36.
176. Uzen R., Tomatir A.G. CND-A. Comet Assay and Applications. *Int J Sci Technol Res.* 2019;5(5):9–16.
177. Kurinnyi D, Rushkovsky S, Demchenko O, Romanenko M, Liashchenko T, Pilinska M. Modification of the tumor/induced bystander effect by irradiation under cocultivation of lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia and lymphocytes from healthy donors. *Probl radiatsiinoi medytsyny ta radiobiolohii.* 2021 Dec;26:248–59.
178. Tuck, A; Smith, S; Larcom L. Chronic lymphocytic leukemia lymphocytes lack the capacity to repair UVC-induced lesions. *Mutat Res Repair.* 2000;459(1):73–80.
179. Yamauchi T, Nowak BJ, Keating MJ, Plunkett W. DNA repair initiated in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes by 4-hydroperoxycyclophosphamide is inhibited by fludarabine and clofarabine. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 2001 Nov;7(11):3580–9.
180. Jurczynszyn, A; Czepiel, J; Gdula-Argasińska, J; Czapkiewicz, A; Biesiada, G; Drózdź, M; Perucki, W; Castillo J. Erythrocyte membrane fatty acids in multiple myeloma patients. *Leuk Res.* 2014;38(10):1260–5.
181. Morimoto Y, Conroy SM, Ollberding NJ, Henning SM, Franke AA, Wilkens LR, et al. Erythrocyte membrane fatty acid composition, serum lipids, and non-Hodgkin's lymphoma risk in a nested case-control study: the multiethnic cohort. *Cancer Causes Control.* 2012 Oct;23(10):1693–703.

182. Korat, AVA; Chiu, Y; Bertrand, KA; Zhang, S; Epstein, MM; Rosner, BA; Chiuve, S; Campos, H; Giovannucci, EL; Chavarro, JE; Birmann M. Red blood cell membrane trans fatty acid levels and risk of non-Hodgkin lymphoma: a prospective nested case–control study. *Am J Clin Nutr.* 2020;112(6):1576–83.
183. Amézaga J, Arranz S, Urruticoechea A, Ugartemendia G, Larraioz A, Louka M, et al. Altered Red Blood Cell Membrane Fatty Acid Profile in Cancer Patients. *Nutrients.* 2018 Dec;10(12).